

Mestrado Integrado em Engenharia Química

Valorização de óleos de peixe através da redução do seu índice de acidez

Tese de Mestrado

de

Ana Isabel Gabriel Pinto

Desenvolvida no âmbito da unidade curricular de Dissertação

realizado em

SAVINOR UTS (do Grupo Soja de Portugal SGPS, SA)



Orientadores na FEUP: Doutora Teresa Margarida Correia de Poço Mata

Doutora Nídia de Sá Caetano

Supervisor na SAVINOR UTS: Doutora Elisabete Alexandra Dias de Matos



Departamento de Engenharia Química

fevereiro de 2016

Agradecimentos

Durante a realização do mestrado, e mais tarde da dissertação percebi que, mais do que “mentes iluminadas” e rasgos de genialidade, a ciência exige, sobretudo, trabalho, persistência, obstinação e dedicação. É por esta razão que quero agradecer o valioso contributo das minhas orientadoras, Doutora Teresa Mata, Doutora Nídia Caetano e também do Doutor António Martins pelo incentivo, disponibilidade, tempo dedicado e enorme simpatia. Obrigada por todo o apoio prestado ao longo de todo este projeto. Não podia deixar de agradecer também à Doutora Elisabete Matos, da Savinor, por toda a ajuda, prontidão e disponibilidade em esclarecer qualquer dúvida.

Às engenheiras Magda e Marília, responsáveis pelo funcionamento do Laboratório de Tecnologia Química, e à Dona Lurdes, auxiliar, por toda a simpatia e disponibilidade com que me receberam no seu espaço. Ao engenheiro Tomás, por todo o apoio à realização deste trabalho.

Às minhas amigas do coração, Bruna e Andreia, que estiveram sempre do meu lado, apesar da distância e do trabalho nem sempre nos proporcionarem momentos de diversão. À minha sempre melhor amiga Patrícia, por todos estes anos de companheirismo.

Aos amigos e colegas de faculdade, que me acompanharam durante estes anos e foram cruciais para a conclusão do curso. Em especial à minha amiga Daniela Portugal, o meu muito obrigada por me acompanhares neste percurso, que nem sempre foi fácil, mas que se tornou maravilhoso por poder partilhar contigo os medos e receios, mas também as vitórias em cada passo alcançado. Muito obrigada por poder contar sempre contigo em todos os momentos, e espero que a entrada na faculdade tenha sido só o início de um elo de ligação que nos una para a vida.

À minha amiga Isabel Trovisco, que conheci aquando da realização deste trabalho e estive sempre comigo, obrigada por toda a paciência, ajuda e colaboração diária nas tarefas. Obrigada por proporcionares dias de trabalho sempre animados e divertidos, tornaste-te sem dúvida uma boa amiga. Foi um prazer conhecer-te e trabalhar contigo!

Por fim, mas nunca menos importante, o meu muito obrigada à minha família, em especial à minha Mãe, ao Rui e à minha filha, por me acompanharem neste sonho, e por todo o amor, carinho, preocupação, esforço, apoio incondicional e incentivo a não desistir nas dificuldades e momentos difíceis. Por isso, este trabalho é dedicado a vocês que tanto se dedicam a mim.

A todos que de alguma forma contribuíram para este trabalho o meu muito obrigada!

“Nada é impossível.

Se puder ser sonhado, então pode ser feito.”

Theodore Roosevelt

Resumo

Anualmente, é produzido cerca de um milhão de toneladas de óleo de peixe no mundo, sendo este usado principalmente como ingrediente no fabrico de rações para aquacultura e animais terrestres. O óleo de peixe é constituído principalmente por triglicerídeos, mono e diglicerídeos (normalmente > 95 % em peso) e também ácidos gordos livres (AGL), água e componentes oxidantes (por ex., metais vestigiais, pigmentos) e compostos que contêm azoto, enxofre e halogéneos. O óleo de peixe é produzido em simultâneo com farinha de peixe, num processo em que os pedaços de peixe são cozidos e a massa resultante é pressionada para remover a maior parte do óleo (2-10 % em peso) e água. Algumas impurezas presentes no óleo extraído são adquiridas durante o manuseamento e armazenamento do peixe ou pedaços de peixe, devido à sua deterioração pela ação microbiana, resultando assim em elevados níveis de AGL (5-15 % em peso), que prejudicam a sua aceitabilidade como ingrediente nas rações, devido ao sabor e cor que conferem ao óleo e porque reduzem a sua estabilidade e tempo de conservação. Assim, existe uma grande preocupação da indústria do óleo de peixe em obter um produto de qualidade satisfatória e aumentar seu valor comercial.

Este trabalho teve como objetivo estudar o processo de redução do teor de AGL de óleo de peixe através de esterificação enzimática, com etanol, convertendo AGL em ésteres etílicos. As amostras de óleo foram recolhidas na empresa SAVINOR, consistindo em misturas de óleos provenientes de subprodutos de diferentes peixes. Os óleos foram caracterizados pelo seu índice de acidez (10-14 mg KOH/g óleo), índice de iodo (109-219 g I₂/100 g óleo), viscosidade cinemática (32-34 mm²/s a 40 °C), densidade (0,932-0,937 g/cm³ a 20 °C) e humidade (0,5-1,8 % em peso). Para realizar a esterificação foram testadas 4 enzimas diferentes como catalisador (Novozym 435, Lipozyme RM IM, Lipozyme CALB L, Palatase 20000 L) e selecionada aquela que originou a maior redução de índice de acidez: Lipozyme® CALB de *Candida antarctica* lipase B da Novozymes. Foram estudadas condições de operação diferentes: temperatura de reação (35, 45 e 55 °C), tempo de reação (de 0 a 180 min), razão mássica enzima/óleo (0,00225 e 0,0045 m/m) e a razão mássica etanol/AGL (3,235, 4,879, 4,907 e 6,566 m/m). Os resultados mostram que, nas melhores condições de operação (após 150 minutos de tempo de reação, a uma temperatura de 45 °C, com razões mássicas enzima/óleo de 0,0045 e etanol/AGL de 4,879 m/m) atingiu-se mais de 70 % de redução do teor de AGL em apenas um passo reacional.

Concluiu-se que a esterificação enzimática tem diversas vantagens, sendo um método eficaz comparativamente à neutralização alcalina convencional, que resulta em perda de produto devido à produção de sabões, e que o método testado reduz as perdas de óleo e permite uma melhor utilização deste recurso, operando a temperaturas relativamente baixas (< 60 °C), reduzindo o consumo e custos de energia e preservando as propriedades nutricionais do óleo.

Palavras-chave: Acidez, esterificação enzimática, gordura animal, óleo de peixe.

Abstract

Around one million tons of fish oil are annually produced worldwide, mostly used as feed ingredient for aquaculture and land animals. Fish oil is primarily composed of triglycerides, mono and di-glycerides (usually > 95 wt%) and also free fatty acids (FFA), moisture, oxidative components (e.g. trace metals, pigments) and compounds containing nitrogen, sulphur and halogens. Fish oil is produced simultaneously with fish meal in a wet rendering process where the whole fish or fish by-products are cooked and the mass is pressed to remove most of the oil (2-10 wt%) and water. Some impurities present in the extracted oil are gained during storage and handling of the fish raw-materials due to its spoilage by microbiological action, resulting in elevated levels of FFA (5-15 wt%) which detract from its acceptability for feedstuff, because of the flavor and color they confer to the oil and because they reduce its stability or shelf-life. Thus, it is a critical concern for the fish oil industry to obtain a product of satisfactory quality and increase its market value.

Hence, this work aimed to study the FFA reduction process through enzymatic esterification with ethanol to convert FFA to ethyl-esters. Fish oil samples were collected in a Portuguese company, containing different mixtures of fish oils. They were characterized for its acid value (10-14 mg KOH/g oil), iodine value (109-219 g I₂/100g oil), kinematic viscosity (32-34mm²/s at 40 °C), density (0.932-0.937 g/cm³ at 20 °C) and moisture content (0.5-1.8 wt%). For the esterification 4 enzymes were tested as catalyst (Novozym 435, Lipozyme RM IM, Lipozyme CALB L, Palatase 20000 L) and selected the one with the largest acid value reduction: Lipozyme® CALB from *Candida antarctica* Lipase B from Novozymes. Different operating conditions were studied: reaction temperature (35, 45 and 55 °C) and time (from 0 to 180 min), enzyme/oil ratio (0.00225 and 0.0045 wt/wt) and ethanol/FFA ratio (3.235, 4.879, 4.907 and 6.566 wt/wt). Results showed that at the best operating conditions (after 150 min of reaction time, at 45 °C of temperature, with an enzyme/oil mass ratio of 0.0045 and an ethanol/FFA mass ratio of 4.879) it is achieved more than 70 % of FFA reduction in just one reaction step.

It is concluded that the enzymatic catalyzed esterification has several advantages, being an effective method for FFA reduction and, in comparison to the alternative conventional alkali neutralization that results in product losses due to soaps production, the tested method reduces oil losses and makes a better utilization of this resource, operating at milder temperatures (< 60 °C), reducing the energy input and costs and preserving the oil nutritional properties.

Key-words: Acid value, enzymatic esterification, animal fat, fish oil

Declaração

Ana Isabel Gabriel Pinto declara, sob compromisso de honra, que este trabalho é original e que todas as contribuições não originais foram devidamente referenciadas com identificação da fonte.

Ana Isabel Gabriel Pinto

Índice

1	Introdução.....	1
1.1	Enquadramento e Apresentação do Tema	1
1.2	Apresentação da Empresa	1
1.2.1	Produção de farinha de penas	2
1.2.2	Produção de farinhas de aves/mamíferos	3
1.2.3	Produção de farinha de peixe.....	4
2	Contexto e Estado da Arte	5
2.1	A indústria conserveira e seus subprodutos	5
2.2	Produção de biodiesel a partir de gorduras animais	6
2.3	Alternativas para aproveitamento de resíduos de peixe	7
2.3.1	Farinha e óleo de peixe	7
2.3.2	Alimentação animal	8
2.3.3	Consumo humano	8
2.4	Principais características do óleo de peixe	8
2.4.1	Processos de neutralização da acidez do óleo de peixe	9
2.4.2	Esterificação enzimática como alternativa para redução do índice de acidez do óleo de peixe	9
3	Descrição Técnica.....	13
3.1	Esterificação Química	13
3.1.1	Caracterização da amostra	13
3.1.1.1	Viscosidade cinemática.....	13
3.1.1.2	Massa volúmica	14
3.1.1.3	Índice de iodo	16
3.1.1.4	Índice de acidez	17
3.1.1.5	Teor de humidade	19
3.1.2	Procedimento experimental para a esterificação química	19
3.2	Esterificação Enzimática.....	22
3.2.1	Caracterização das amostras.....	22

3.2.2	Escolha da melhor enzima	23
3.2.3	Procedimento experimental para a esterificação enzimática	23
3.2.3.1	Ensaio padrão	24
3.2.3.2	Variação da temperatura de reação	25
3.2.3.3	Variação da razão mássica enzima/óleo	25
3.2.3.4	Variação da razão mássica álcool/AGL	25
3.2.3.5	Variação do tipo de álcool	25
3.2.3.6	Ensaio final - Melhores condições operacionais	25
4	Resultados e Discussão.....	27
4.1	Esterificação Química	27
4.1.1	Caracterização da amostra	27
4.1.2	Reação de esterificação química.....	27
4.2	Esterificação Enzimática.....	29
4.2.1	Caracterização das amostras.....	29
4.2.2	Escolha da melhor enzima	30
4.2.3	Reação de esterificação enzimática	31
4.2.3.1	Ensaio padrão	31
4.2.3.2	Variação da temperatura de reação	32
4.2.3.3	Variação da razão mássica enzima/óleo	34
4.2.3.4	Variação da razão mássica álcool/AGL	36
4.2.3.5	Variação do tipo de álcool	39
4.2.3.6	Ensaio final - Melhores condições operacionais	40
4.2.4	Cálculo da ordem de reação e da energia de ativação.....	41
5	Conclusões	45
	Referências	47
	Anexo 1	51

Índice de Figuras

Figura 1 - Produção de conservas de peixe em Portugal. Adaptado de Castro e Melo, 2012. ..	5
Figura 2 - Reação de transesterificação para a produção de biodiesel.	7
Figura 3 - Reações típicas catalisadas por lipases. Adaptado de Bon et al., 2008.....	12
Figura 4 - Amostra de óleo de peixe composta por atum (70%) e sardinha (30%).	13
Figura 5 - a) Determinação da viscosidade cinemática; b) Viscosímetro de Cannon-Fenske...	14
Figura 6 - a) Picnómetro vazio; b) Picnómetro com água destilada; c) Picnómetro com óleo de peixe.....	15
Figura 7 - Ensaios feitos com e sem toma de amostra.	16
Figura 8 - Determinação do índice de iodo: a) antes da titulação; b) depois da titulação.	17
Figura 9 - Determinação do índice de acidez: a) antes do ponto de equivalência; b) depois do ponto de equivalência.	18
Figura 10 - Equipamento utilizado para determinar o teor de humidade (Karl Fischer).	19
Figura 11 - Amostras de óleo de peixe para reação de esterificação por via química.	19
Figura 12 - Lavagem do óleo esterificado.	20
Figura 13 - pH da água de lavagem medido ao longo do tempo.....	20
Figura 14 - Determinação do índice de acidez: (a) antes e (b) depois da titulação, respetivamente.	21
Figura 15 - Amostras de óleo de peixe utilizadas na esterificação enzimática.	22
Figura 16 - Enzimas Palatase 20000L, Lipozyme CALB L, Lipozyme RM IM e Novozym 435. ...	23
Figura 17 - Banho termostático com agitação magnética.	24
Figura 18 - Lavagem do óleo de peixe após esterificação enzimática.	25
Figura 19 - Variação do índice de acidez em função do tempo a T=60 °C e 60 rpm, com uma razão catalisador/óleo de 0,003 m/m e uma razão mássica de álcool/AGL de 2,235 m/m. ...	28
Figura 20 - Ensaio padrão da reação de esterificação enzimática: T=45 °C, na razão etanol/AGL de 3,14 m/m e na razão enzima/óleo de 0,00225 m/m.....	32
Figura 21 - Variação do índice de acidez em função do tempo a T=55 °C, na razão etanol/AGL de 3,14 m/m e na razão enzima/óleo de 0,00225 m/m.	32

Figura 22 - Variação do índice de acidez em função do tempo a $T=35\text{ }^{\circ}\text{C}$, na razão etanol/AGL de 3,283 m/m e na razão enzima/óleo de 0,00225 m/m.	33
Figura 23 - Variação do índice de acidez em função do tempo a $T=40\text{ }^{\circ}\text{C}$, na razão etanol/AGL de 3,238 m/m e na razão enzima/óleo de 0,00225 m/m.	33
Figura 24 - Variação do índice de acidez em função do tempo para as diferentes temperaturas: $35\text{ }^{\circ}\text{C}$, $40\text{ }^{\circ}\text{C}$, $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $55\text{ }^{\circ}\text{C}$	34
Figura 25 - Variação do índice de acidez em função do tempo a $T=45\text{ }^{\circ}\text{C}$, na razão etanol/AGL de 3,283 m/m e na razão enzima/óleo de 0,0045 m/m.	35
Figura 26 - Variação do índice de acidez em função do tempo para o ensaio padrão e para o ensaio com o dobro da enzima.	35
Figura 27 - Variação do índice de acidez em função do tempo a $T=45\text{ }^{\circ}\text{C}$, na razão etanol/AGL de 6,566 m/m e na razão enzima/óleo de 0,00225 m/m.	36
Figura 28 - Variação do índice de acidez em função do tempo para o ensaio padrão e para o ensaio com o dobro do álcool.	37
Figura 29 - Variação do índice de acidez em função do tempo a $T=45\text{ }^{\circ}\text{C}$, na razão etanol/AGL de 4,907 m/m e na razão enzima/óleo de 0,00225.	38
Figura 30 - Variação do índice de acidez em função do tempo para as diferentes quantidades de álcool adicionadas: padrão, dobro e +50 %.	38
Figura 31 - Variação do índice de acidez em função do tempo a $T=45\text{ }^{\circ}\text{C}$, na razão butanol/AGL de 5,13 m/m e na razão enzima/óleo de 0,00225 m/m	39
Figura 32 - Emulsão formada na lavagem do óleo esterificado com butanol.	39
Figura 33 - Variação do índice de acidez em função do tempo a $T=45\text{ }^{\circ}\text{C}$, na razão etanol/AGL de 4,879 m/m e na razão enzima/óleo de 0,0045 m/m.	40
Figura 34 - Representação gráfica de $-\ln(C_{\text{ácido oleico}}/C_{\text{ácido oleico inicial}})$ em função do tempo - cinética de 1ª ordem.	41
Figura 35 - Representação gráfica de $1/C_{\text{ácido oleico}}$ em função do tempo - cinética de 2ª ordem.	42
Figura 36 - Representação gráfica de $\ln(k_{app})$ em função de $1/T$	43
Figura 37 - Variação do índice de acidez em função do tempo a $T=60\text{ }^{\circ}\text{C}$ e 60 rpm, com uma razão catalisador/óleo de 0,003 m/m e uma razão mássica de álcool/AGL de 2,235 m/m (2º ensaio).	51

Figura 38 - Ensaio padrão da reação de esterificação enzimática: T=45 °C, na razão etanol/AGL de 3,14 m/m e na razão enzima/óleo de 0,00225 m/m (2º ensaio).	51
Figura 39 - Variação do índice de acidez em função do tempo a T=55 °C, na razão etanol/AGL de 3,14 m/m e na razão enzima/óleo de 0,00225 m/m (2º ensaio).....	52
Figura 40 - Variação do índice de acidez em função do tempo a T=35 °C, na razão etanol/AGL de 3,283 m/m e na razão enzima/óleo de 0,00225 m/m (2º ensaio).	52
Figura 41 - Variação do índice de acidez em função do tempo a T=45 °C, na razão etanol/AGL de 3,283 m/m e na razão enzima/óleo de 0,0045 m/m (2º ensaio).	52
Figura 42 - Variação do índice de acidez em função do tempo a T=45 °C, na razão etanol/AGL de 6,566 m/m e na razão enzima/óleo de 0,00225 m/m (2º ensaio).	52
Figura 43 - Variação do índice de acidez em função do tempo a T=45 °C, na razão etanol/AGL de 4,907 m/m e na razão enzima/óleo de 0,00225 (2º ensaio).	52
Figura 44 - Variação do índice de acidez em função do tempo a T=45 °C, na razão etanol/AGL de 4,879 m/m e na razão enzima/óleo de 0,0045 m/m (2º ensaio).	52
Figura 45 - Representação gráfica de $-\ln(C_{\text{ácido oleico}} / C_{\text{ácido oleico inicial}})$ em função do tempo - cinética de 1ª ordem (2º ensaio).	52
Figura 46 - Representação gráfica de $1/C_{\text{ácido oleico}}$ em função do tempo - cinética de 2ª ordem (2º ensaio).	52

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Classificação internacional de enzimas (Nelson e Cox., 2011).	10
Tabela 2 - Propriedades do óleo de peixe para esterificação química.	27
Tabela 3 - Propriedades do óleo de peixe utilizado para a esterificação enzimática.	29
Tabela 4 - Índices de acidez ao fim de 3 h para as várias enzimas testadas.	30
Tabela 5 - Índices de acidez ao fim de 1 h:30 min e 3 h, usando as enzimas Lipozyme RM IM e Lipozyme CALB L.....	31
Tabela 6 - Constantes cinéticas aparentes (k_{app}) para as temperaturas de 35 °C, 40 °C, 45 °C e 55 °C.	43
Tabela 7 - Valores da energia de ativação e fator pré-exponencial para a reação de esterificação enzimática às temperaturas de 35 °C, 40 °C e 45 °C.....	44

Notação e Glossário

Letras gregas

ν Viscosidade cinemática

ρ Massa volúmica

Lista de Símbolos

°C grau Celsius

ex. exemplo

g grama

h hora

K Kelvin

kg quilograma

kJ quilojoule

L litro

m massa

mg miligrama

min minuto

mL mililitro

mm milímetro

mol mole

s segundo

T temperatura

t tonelada

Lista de Siglas

AGL ácidos gordos livres

EC Enzyme Comission

Ea	Energia de ativação
ETAR	Estação de Tratamento de Águas Residuais
I ₂	Iodo
IA	índice de acidez
IUB	União Internacional de Bioquímica
KOH	hidróxido de potássio
NaOH	hidróxido de sódio
NP	Norma Portuguesa
R	Constante dos gases ideais

1 Introdução

1.1 Enquadramento e Apresentação do Tema

A indústria agropecuária é responsável por uma elevada produção de subprodutos, que podem ter elevado teor de gordura. O crescimento deste tipo de indústria levanta algumas preocupações ambientais e económicas, uma vez que os resíduos gordurosos requerem um tratamento específico e caro. Assim sendo, cada vez mais existe o cuidado de procurar alternativas que reduzam o impacto ambiental, no que respeita ao tratamento de subprodutos de origem animal, para que sejam geridos de forma adequada evitando descargas poluentes para o ambiente.

Por conter uma elevada quantidade de ácidos gordos livres (AGL), a gordura animal necessita de um elevado controlo no que diz respeito ao seu índice de acidez, uma vez que este afeta a sua qualidade e pode interferir na sua conservação. De acordo com o fim a que se destinam as gorduras, existem limites de acidez que devem ser respeitados. Tendo isto em conta, este trabalho teve como objetivo o estudo da melhoria da qualidade de óleo de peixe, obtido da valorização de subprodutos de peixe, de modo a criar soluções eficientes, económica e ambientalmente sustentáveis para a redução do seu índice de acidez, a fim de se obter um produto com maior valor comercial e se avaliar a possibilidade de implementar estas mesmas soluções a nível industrial.

1.2 Apresentação da Empresa

A Savinor UTS, integrada na empresa Savinor, é a mais recente aposta do Grupo Soja de Portugal. Desde a sua aquisição, em 2006, foram efetuados inúmeros investimentos, munindo as unidades industriais das melhores tecnologias disponíveis tanto a nível produtivo como ambiental. Esta área de negócio é responsável pela recolha de subprodutos em mais de 250 pontos de recolha em Portugal e Espanha.

Na Savinor, são valorizados subprodutos de mamíferos (normalmente 70% suíno e 30% ruminantes), de aves (essencialmente frango, mas também pequenas quantidades de peru, faisão, entre outros) e de peixe.

Os subprodutos animais são divididos por três categorias, de acordo com o seu grau de perigosidade:

- Categoria 1: perigosos para a saúde pública (animais mortos por doença, etc.);
- Categoria 2: impróprios para consumo humano, mas não constituem perigo para a saúde pública;

- Categoria 3: próprios para consumo humano.

Deste modo, e de acordo com a categoria em que foram inseridos, os subprodutos de cada categoria têm destinos diferentes, sendo que a Savinor apenas recebe subprodutos das categorias 2 e 3: os subprodutos que se inserem na categoria 1, têm que ser incinerados fora da Savinor, uma vez que nesta empresa não existem unidades de tratamento para os mesmos; os subprodutos da categoria 2, são utilizados para produção de biodiesel, adubos e fertilizantes e por fim, os subprodutos de categoria 3 são destinados à alimentação animal (farinha e gordura de aves, mamíferos e peixe e ainda farinha de penas).

Em termos de unidades de produção da Savinor, a empresa está organizada da seguinte forma: uma unidade de produção de óleo e farinha de peixe, uma unidade de produção de gordura e farinha de mamíferos e aves (os dois tipos de subprodutos, ainda que na mesma unidade, estão perfeitamente isolados em linhas de produção diferentes para evitar contaminações) e uma unidade de produção de farinha de penas.

O Verão é o período do ano em que maior quantidade de matéria-prima é recebida diariamente:

- > 60 ton subprodutos de mamíferos por dia;
- 70 ton subprodutos de aves por dia;
- 90-100 ton subprodutos de peixe por dia;

Em Setembro, aquando da visita à empresa, foram tratadas:

- 40 ton subprodutos de mamíferos por dia;
- 60 ton subprodutos de aves por dia;
- 70 ton subprodutos de peixe por dia;

Nos meses de Verão, devido às elevadas temperaturas, é utilizado um protetor de subproduto (mistura de ácido lignosulfónico e ácido acético) de modo a tornar o produto manuseável e evitar a sua degradação. Este protetor é adicionado ainda nos fornecedores. De igual modo, no fim do processo, são adicionados antioxidantes (no caso do peixe, etoxiquina e no caso das aves, BHA e BHT) nas farinhas e gorduras produzidas.

1.2.1 Produção de farinha de penas

A farinha de penas é produzida na Savinor através de um processo Batch com cargas de cerca de 1,5 toneladas por digestor.

As penas e sangue (normalmente 95 % de frango e 5 % de faisão) são descarregadas em tolvas de receção que alimentam o digestor. Este é calibrado de modo a que no seu interior exista uma pressão de 3 bar e uma temperatura de 120 °C. O digerido passa seguidamente por um secador, com o objetivo de retirar a humidade (que deve ser inferior a 1 %) e é depois

descarregado para uma tolva arrefecida e passada por um crivo para retirar partículas maiores. A farinha é depois embalada em big bags, ficando assim pronta para expedição.

1.2.2 Produção de farinhas de aves/mamíferos

Tal como acontece com a farinha de penas, a farinha de aves/mamíferos é produzida através do método Batch.

Os subprodutos destas carnes provenientes das tolvas de receção passam por um destroçador de modo a fazer uma trituração prévia (com limite máximo de 40 mm) para garantir que a esterilização chegue ao núcleo das partículas.

Seguidamente vão para um digestor cuja temperatura está regulada para uma temperatura mínima de 101 °C, pressão máxima de 6 bar (na camisa em torno do digestor) e tempo de ciclo de 110 min (em média no interior do digestor está à temperatura de 110-115 °C, sendo que se passar acima dos 116 °C o digerido queima), até atingir um teor de humidade de aproximadamente 0 %. Portanto, esta etapa do processo permite a eliminação de toda a água existente nos subprodutos animais (mais de 60 % de água é libertada na digestão). Dentro do digestor existe um veio com pás gigantes que promove a mistura no seu interior, com movimento à rectaguarda para manter o material dentro do digestor, e depois muda para movimento para a frente quando se pretende fazer a descarga do digestor.

Após este período, o material digerido é descarregado numa tolva e em seguida encaminhado para uma prensa, na qual o material é esmagado e separada a torta/farinha dos óleos/gorduras. Neste ponto dá-se a prensagem, que é passo mais importante deste processo, uma vez que é aqui que se verifica se há ou não degradação do produto - uma maior amperagem do equipamento mostra-nos que o produto está a oferecer uma maior resistência o que indica uma separação mais efetiva. É nesta prensa que se separa a farinha e a gordura, que seguem destinos distintos.

A torta ou farinha vai ser arrefecida por meio de um parafuso sem-fim com sistema de arrefecimento por contracorrente de ar. De seguida vai para o moinho, onde é moída até à granulometria pretendida, passando depois por um peneiro. Finalmente, a farinha peneirada é levada por elevador de alcatruz para o silo de armazenagem e/ou, consoante a necessidade de escoamento e encomendas de produto, para a estação de ensaque onde é colocada em big bags. A farinha cuja granulometria não é a apropriada, volta a reentrar no processo de modo a que regresse ao moinho para nova moagem. Quanto à gordura, vai passar por um crivo para que se dê a filtragem do óleo (as partículas maiores reentram no digestor e o óleo passa para um depósito intermédio de armazenamento). Após este passo, o óleo passa por um tricanter ou centrífuga de três fases (a operar a 3000-3500 rpm), onde é adicionada água a 50 °C, de modo a fazer-se a separação horizontal das três fases: gorduras, lamas e água. A gordura que daqui

resulta é então armazenada, a água é direcionada para a ETAR e as lamas são reintroduzidas no processo de produção (na tolva de recepção do digestor).

1.2.3 Produção de farinha de peixe

Ao contrário do que acontece com as farinhas de penas e aves/mamíferos, a farinha de peixe não é produzida por processo Batch, mas sim contínuo, e é um processo de via húmida, acabando por isso por ser menos dispendioso quer a nível energético quer a nível económico, uma vez que durante o processo não é necessário remover a água na totalidade.

Os subprodutos de peixe vindos das 2 tolvas de receção com capacidade de 40 ton cada uma, passam por um triturador e posteriormente por um cozedor rotativo e contínuo, estando este regulado para uma rotação $\leq 45\%$ da capacidade do aparelho e para uma temperatura $\geq 101^\circ\text{C}$, sendo o tempo de passagem entre 15 e 20 min.

Após a cozedura, o produto resultante passa por um percolador, de modo a lixiviar alguma da água associada ao produto. Seguidamente dá-se a prensagem, onde a parte sólida (farinha) é separada da parte líquida (designada por água de prensa - mistura de água e óleo de peixe).

A farinha passa através de um parafuso sem-fim para um secador, onde é garantido um máx. de 8 % de teor de humidade, e é encaminhado novamente através de um parafuso sem-fim arrefecido para o moinho, de modo a que atinja a granulometria desejada. A farinha é peneirada e as partículas de maiores dimensões removidas reentram no processo, a seguir à prensa, para serem moídas novamente e assim reaproveitadas, ao passo que aquelas cujo tamanho é o desejado é ensacada e pronta para expedição.

A água de prensa é armazenada num reservatório e alimentada ao tricanter ou centrífuga de três fases, onde é separada o óleo da água e dos sólidos. O óleo é armazenado à espera de ser carregado. A água que sai da centrífuga aglomera uma grande quantidade de nutrientes devido ao elevado teor proteico do peixe, por isso essa água, também designada “água de cola” vai para umas torres de evaporação para se formar um concentrado nutricional que é reintroduzido no processo (a seguir à prensa), junto com a farinha ou torta.

2 Contexto e Estado da Arte

2.1 A indústria conserveira e seus subprodutos

A abundância de peixe e a sua qualidade, a extensão da linha de costa e a tradicional inclinação para as artes de pesca, aliadas à simplicidade da técnica, criaram em Portugal condições singulares no que diz respeito ao estabelecimento da indústria conserveira.

Em 1938 existiam em Portugal 152 fábricas de conservas que produziam cerca de 34000 toneladas de conservas de peixe. Atualmente existem 20 fábricas em laboração que produzem 58500 toneladas de conservas de peixe, sendo um setor tradicional da economia portuguesa com mais de 150 anos. A sardinha é o recurso mais utilizado pela indústria conserveira portuguesa e do qual dependem, embora não exclusivamente, quase todas as fábricas situadas em Portugal Continental, pelo facto de ser abundante na costa portuguesa, representando mais de 40 % dos totais de capturas da frota nacional.

Tal como foi referido no parágrafo anterior, em Portugal produzem-se 58500 t de conservas de peixe, sendo esta quantidade distribuída da seguinte forma: 28000 t de sardinha, 16000 t de cavala, 14000 t de atum e 500 t de outras espécies (Figura 1).

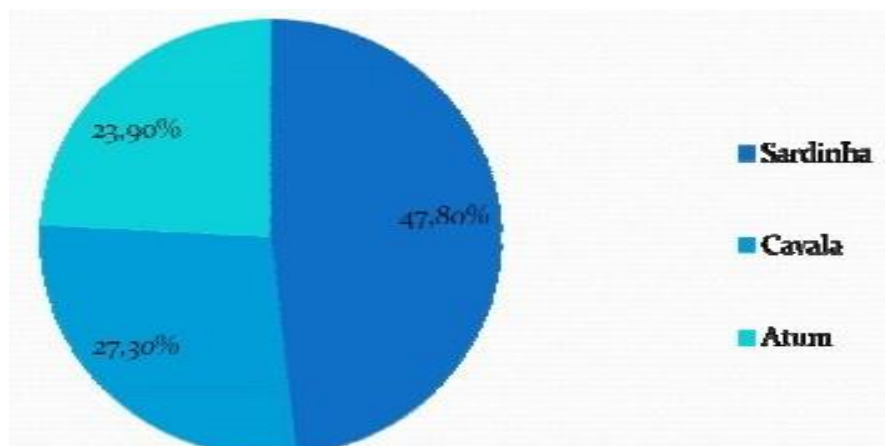


Figura 1 - Produção de conservas de peixe em Portugal. Adaptado de Castro e Melo, 2012.

O processo de industrialização do peixe envolve a sua obtenção, conservação, processamento, embalagem, transporte e comercialização (Feltres et al., 2010). Numa fase inicial, os peixes são seleccionados por tamanho, sendo posteriormente lavados e congelados, caso não sejam processados imediatamente.

Os resíduos gerados na preparação do peixe incluem essencialmente cabeças, vísceras e escamas. O termo resíduo refere-se às sobras e aos subprodutos do processamento dos

alimentos que são de valor relativamente baixo (Arruda, 2004). Estima-se que o volume de resíduos gerados pelas unidades processadoras atinja aproximadamente metade da produção e que, dependendo da espécie, pode chegar a 66 % em relação ao seu peso total (Conteras-Guzmán, 1994).

O destino dado aos resíduos da piscicultura constitui um problema para os produtores. Embora seja um material biodegradável, quando lançado em elevada quantidade nos rios, causa danos ao meio ambiente e desequilibra o ecossistema (Arruda, 2004).

As águas residuais geradas na industrialização de peixe contêm sólidos suspensos totais, restos de peixe e elevada carência química e bioquímica de oxigénio (Arruda, 2007; Banco do Nordeste, 1999), motivo pelo qual toda a água gerada no processo deve ser encaminhada para uma estação de tratamento de efluentes. As tecnologias existentes para a utilização dos resíduos das indústrias de peixe não se mostram economicamente atrativas, devido ao elevado investimento inicial. Os aterros sanitários e lagoas de tratamento de efluentes não são alternativas recomendáveis, devido ao odor desagradável que provocam nas áreas costeiras, impedindo que as mesmas sejam exploradas como centros de lazer (Lustosa Neto, 2004).

As diferentes formas de se aproveitar estes resíduos, estão diretamente relacionadas com a quantidade dos mesmos que é produzida, podendo ser direcionados para produção de alimentos para consumo humano, alimentos para consumo animal (rações), fertilizantes ou adubos orgânicos, produtos químicos e, ainda, aproveitá-los no desenvolvimento de produtos funcionais como quitosana, cálcio de ostra, óleo rico em Ômega 3 e outros produtos de valor acrescentado (Nunes, 2011).

A produção de farinha e óleo de peixe requer grandes quantidades de subprodutos, tornando-se assim uma atividade dispendiosa para pequenos produtores, mas muito vantajosa no que toca à produção em larga escala, uma vez que o destino correto destes subprodutos permite que uma receita adicional seja gerada para as unidades processadoras, com a inserção de novos produtos no mercado, evitando desperdícios e o impacto no meio ambiente. É neste contexto que surge o óleo de subprodutos de peixe para a alimentação animal (produção de rações) e como alternativa para a obtenção de biodiesel.

2.2 Produção de biodiesel a partir de gorduras animais

A definição do biodiesel foi criada por G. Chavanne, como sendo uma mistura de ésteres metílicos ou etílicos de ácidos gordos, isto é, ésteres alquílicos de cadeia longa de ácidos gordos formados a partir da transesterificação ou esterificação de óleos vegetais ou gorduras de animais com metanol ou etanol, a partir de vários processos químicos ou biológicos, tendo aparecido para resolver os problemas da elevada viscosidade e aumentar a eficácia da combustão dos óleos que deixavam depósitos de carbono nos motores. Alguns exemplos de

gorduras animais que podem ser transformadas em biodiesel são o sebo de bovino, a banha de porco, a gordura de frango e outras matérias gordas de origem animal. Tal como foi referido no parágrafo anterior, o processo mais importante para a produção deste biocombustível é a transesterificação de óleos ou gorduras (animais ou vegetais) com álcool, obtendo-se no final uma mistura de ésteres metílicos de ácidos gordos (o biodiesel), e glicerol como subproduto, conforme indicado na Figura 2.

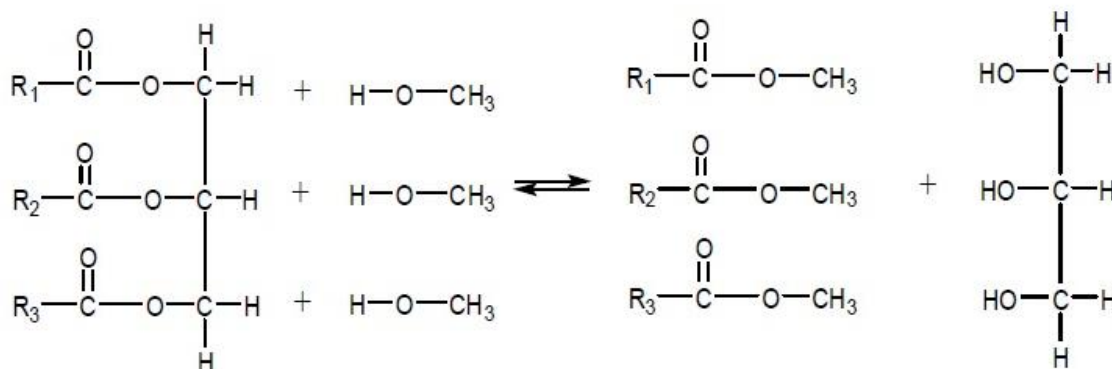


Figura 2 - Reação de transesterificação para a produção de biodiesel.

No entanto, os óleos de peixe para biodiesel não são muito usados. Isto deve-se ao facto do preço do óleo de peixe ser muito elevado em comparação com os óleos vegetais e terem na sua composição demasiados ácidos gordos poli-insaturados (com mais do que 3 ligações duplas por molécula), que afectam negativamente a qualidade do biodiesel devido à formação de coque na queima deste nos motores, que acumula e entope os injectores.

2.3 Alternativas para aproveitamento de resíduos de peixe

2.3.1 Farinha e óleo de peixe

A farinha de peixe é um produto seco, obtido a partir da cozedura de subprodutos gerados tanto da produção quanto da industrialização ou da comercialização de peixe. No processo de obtenção da farinha extrai-se o óleo; portanto, na mesma linha de processamento obtêm-se dois produtos: óleo e farinha de peixe.

As quantidades de farinha e de óleo de peixe obtidas após o processamento de subprodutos dependem de vários fatores, sendo o tamanho do peixe e o sistema de produção os que mais influem nos resultados finais. Para efeito de cálculo, o processamento de subprodutos de peixe com peso de abate de até 800 g produz, em média, 85 % de farinha e 15 % de óleo, enquanto peixes com peso acima de 800 g podem gerar uma percentagem de 70 % de farinha e 30% de óleo. Em geral, o óleo de peixe é composto de uma variedade de ácidos gordos (saturados,

mono e poliinsaturados) e elevado teor de vitaminas, em especial a vitamina A (Pacheco e Barrera-Arellano, 1994; Pessatti, 2001; Feltes et al., 2010).

2.3.2 Alimentação animal

O pescado, devido às suas características nutricionais que se aproximam da composição química de aves, bovinos e suínos, apresenta elevados teores de proteína e gordura variáveis, porém com inúmeras vantagens nutricionais.

Com o aumento da produção de peixe, cresceu também a procura por fontes protéicas alternativas, preferencialmente mais económicas, para a suplementação de dietas de peixe (Vendruscolo et al., 2009). O elevado teor protéico encontrado no peixe faz com que o principal destino dos subprodutos do seu processamento sejam para a produção de farinha de peixe para alimentação animal, produto que apresenta cerca de 70 % de proteína com a vantagem do baixo custo (Arruda et al., 2006; Seibel e Soares, 2003, Feltes et al., 2010). Apesar de ser amplamente produzida a partir de resíduos de peixe, a farinha obtida pelo método tradicional geralmente apresenta baixa qualidade. A comercialização da farinha proporciona um retorno económico relativamente baixo para a indústria, levando-se em conta principalmente que a linha de produção deste subproduto exige grande investimento, equipamentos especiais e elevado consumo energético.

2.3.3 Consumo humano

A viabilidade do aproveitamento dos resíduos do peixe visando à produção de alimentos para o consumo humano depende, fundamentalmente, da qualidade da matéria-prima estando assim diretamente relacionada com cuidados na manipulação e conservação do peixe a baixas temperaturas, em toda a cadeia produtiva e com a aplicação de procedimentos adequados de limpeza e sanitização da área processadora (Morales-Ulloa e Oetterer, 1995; Nunes, 2001; Pessatti, 2001).

Para a utilização de óleo extraído de resíduos de peixe para alimentação humana, é imprescindível tomar cuidados na conservação do peixe no momento da captura, bem como na recepção, armazenamento, processamento e manipulação da matéria-prima. O processamento dos resíduos deverá contemplar ainda etapas de adição de antioxidantes (Zuta et al., 2007, Feltes et al., 2010).

2.4 Principais características do óleo de peixe

O principal problema relacionado com a qualidade do óleo é o aumento da sua acidez. Com efeito, a determinação da acidez pode fornecer um dado valioso na apreciação do estado de conservação e qualidade de um óleo. A decomposição dos glicerídeos é acelerada por

aquecimento e pela luz, sendo a formação de ranço quase sempre acompanhada pela formação de ácidos gordos livres.

Os métodos de determinação da acidez podem ser os que avaliam a acidez titulável ou fornecem a concentração de íões de hidrogénio livres, por meio do pH.

2.4.1 Processos de neutralização da acidez do óleo de peixe

Para diminuir a acidez de um óleo, um dos processos normalmente realizados consiste na sua neutralização ou saponificação. Neste processo é adicionada uma solução alcalina ao óleo bruto, geralmente hidróxido de sódio, ocorrendo reações químicas de saponificação e os sabões formados têm depois de ser separados por processos físicos. Neste processo, a concentração da solução de NaOH, o tempo de mistura, a temperatura e a quantidade de excesso cáustico são fatores importantes para a eficiência e efetividade da correção da acidez, sendo que a base reage com os ácidos gordos livres formando sabões. Com aquecimento e tempo, o excesso de solução cáustica pode levar à saponificação do óleo neutro (O'Brien, 2009).

Existem dois métodos principais de neutralização: o mais antigo chamado de descontínuo e o mais moderno, contínuo. Além disso, existem dois modos de aplicação da solução alcalina: a adição de solução de hidróxido de sódio ao óleo (método mais usado), e a adição de óleo à solução aquosa de hidróxido de sódio, método contínuo “Zenith”. De acordo com o teor em de AGL no óleo bruto, aplicam-se diferentes concentrações de solução alcalina e condições de processo apropriadas.

A principal vantagem da utilização deste processo reacional é a possibilidade de não só converter triglicerídeos como também os ácidos gordos livres (AGL) existentes, permitindo assim a utilização de óleos com altos valores de ácidos gordos livres. A principal desvantagem resulta do elevado teor de sais no produto final e da perda de produto (triglicéridos), uma vez que este processo não é selectivo apenas para os AGL, mas também uma parte dos triglicéridos são convertidos em sabões. Para além disso, este processo possui elevados custos de operação em catalisadores, e em operações de separação/purificação.

2.4.2 Esterificação enzimática como alternativa para redução do índice de acidez do óleo de peixe

Os ésteres são uma das mais importantes classes de compostos orgânicos que são sintetizados por vários mecanismos, entre eles, a reação entre um álcool e um ácido carboxílico, com a formação de água, denominada esterificação.

A esterificação é geralmente realizada por via química, o que apresenta uma série de desvantagens, como por exemplo, a formação de muitos produtos indesejáveis e um elevado

consumo de energia. Como alternativa ao processo convencional de esterificação química, a síntese enzimática, envolvendo lipases, apresenta diversas vantagens, pois, dependendo da metodologia e da enzima aplicada, pode garantir maiores rendimentos em reações com temperaturas próximas da ambiente, o que proporciona produtos de qualidade, com economia de energia e reduzida ocorrência de subprodutos.

As enzimas são uma classe de moléculas sintetizadas pelas células, aptas a catalisar as biotransformações que ocorrem nos organismos vivos sendo ainda consideradas como “catalisadores ecologicamente corretos”, atendendo aos princípios da química verde - green chemistry. Atualmente estão listadas cerca de 5400 enzimas na base de dados da Enzyme Nomenclature Database, mas apenas 150 a 170 são utilizadas em escala industrial.

Em 1961, a Comissão para Enzimas (Enzyme Commission - EC) da União Internacional de Bioquímica (IUB) normatizou uma classificação e nomenclatura de enzimas e de coenzimas (Cabral et al., 2003). A EC classificou as enzimas por meio das suas propriedades catalíticas, podendo ser: oxidorredutases, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases, como mostra a Tabela 1. Essas classes são posteriormente divididas em subclasses para especificar o tipo de reação e a natureza química dos reagentes.

Tabela 1 - Classificação internacional de enzimas (Nelson e Cox., 2011).

Nº	Classe	Tipo de reação catalisada
1	Oxidoreductases	Transferência de elétrons (íons hidretos ou átomos de H)
2	Transferases	Reações de transferência de grupos
3	Hidrolases	Reações de hidrólise (transferência de grupos funcionais da água)
4	Liasas	Adição de grupos a ligações duplas, ou formação de duplas ligações pela remoção de grupos
5	Isomerases	Transferência de grupos dentro de moléculas para produzir formas isoméricas
6	Ligases	Formação de ligações C-C, C-S, C-O e C-N

A utilização de enzimas em síntese orgânica apresenta muitas vantagens em relação a muitas reações da química orgânica convencional:

- As reações catalisadas por enzimas são realizadas em condições brandas com temperatura a cerca de 37°C, pressão de 1 atm e pH \approx 7,0. Estas reações apresentam um excelente balanço energia-eficiência quando comparadas com processos químicos;
- As enzimas apresentam elevada quimiosseletividade, regiosseletividade e estereosseletividade, além de possibilitar a geração de produtos com atividade ótica;

- As enzimas podem promover reações que dificilmente podem ser simuladas pelas técnicas da síntese orgânica convencional;
- As enzimas são catalisadores naturais que trazem benefícios comerciais e/ou ecológicos;
- As enzimas usam, normalmente, água como meio reacional. Por outro lado, dificultam uma série de reações orgânicas pela baixa solubilidade dos reagentes em água. Entretanto, existem algumas enzimas (como as lipases) que funcionam como catalisadores em meio orgânico.

As enzimas lipolíticas ou lipases (EC 3.1.1.3) são hidrolases que atuam na interface orgânico-aquosa, catalisando a hidrólise de ligações éster-carboxílicas e libertando ácidos e álcoois orgânicos. Contudo, ao contrário de muitas outras enzimas, as lipases apresentam níveis consideráveis de atividade e estabilidade em ambientes não-aquosos, facilitando a catálise de muitas reações de interesse industrial.

As lipases são obtidas na natureza e produzidas por diversas plantas, animais e micro-organismos, mas apenas as lipases microbianas são aplicadas industrialmente, pois apresentam grande diversidade de propriedades e especificidade de substrato. As lipases obtidas a partir de animais apresentam desvantagens quanto à sua utilização devido à presença de tripsina, além da presença de hormonas residuais dos animais. As lipases de plantas também estão disponíveis, mas não são exploradas comercialmente em função dos baixos rendimentos de catálise e dos processos envolvidos para extração. Deste modo, as lipases microbianas recebem atualmente mais atenção por causa das suas vantagens técnico-económicas, apresentando relativamente baixo custo de produção, elevado rendimento de conversão de substrato em produto, grande versatilidade em adaptar-se às condições ambientais e facilidade de manipulação genética.

As lipases têm encontrado aplicações em diversos tipos de indústrias, tais como de alimentos, química fina (síntese de ésteres), tratamento de efluentes e farmacêutica. De uma forma geral, estas enzimas têm aplicações versáteis decorrentes das suas propriedades. Em condições naturais, elas catalisam a hidrólise de ligações ésteres carboxílicos e síntese orgânica. Em condições não aquosas, incluindo solventes orgânicos e em fluidos supercríticos, catalisam reações como esterificação, interesterificação e transesterificação produzindo glicerídeos a partir de glicerol e ácidos gordos (Figura 3).

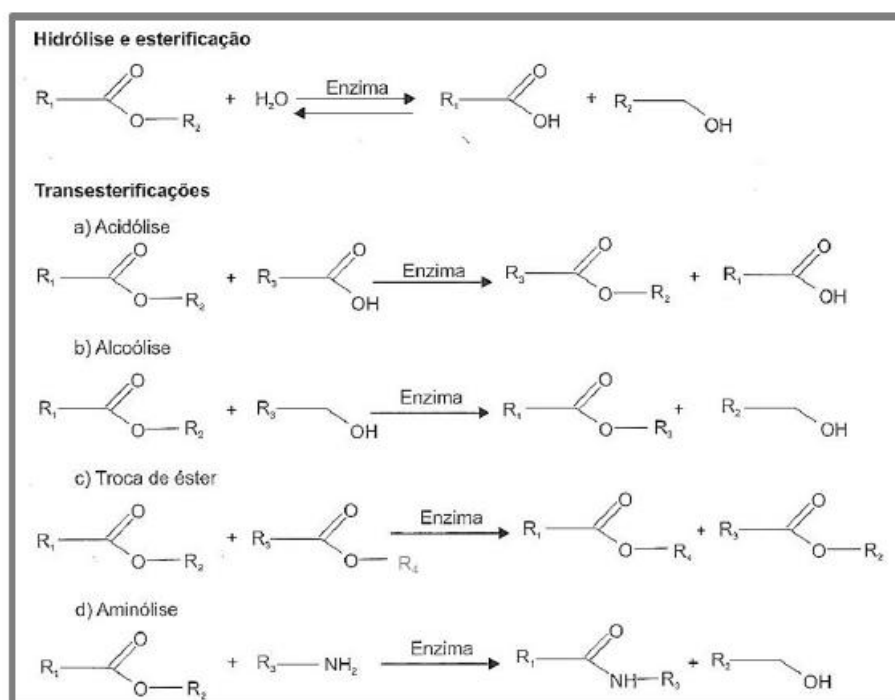


Figura 3 - Reações típicas catalisadas por lipases. Adaptado de Bon *et al.*, 2008.

Nas reações de esterificação, a água gerada é considerada o parâmetro mais importante que precisa de ser controlado, uma vez que, a partir de determinada concentração, ela inibe a reação. Mesmo sob condições de baixa concentração de água, durante o curso da reação, é formado 1 mol de água por cada mol de éster sintetizado. Como os solventes hidrofílicos são geralmente evitados para prevenir a inativação da enzima, a formação desta fase aquosa pode ocorrer facilmente durante a reação. Assim, a remoção de água por diversas metodologias pode prevenir este fenómeno e ajudar a reação a alcançar elevadas conversões.

3 Descrição Técnica

3.1 Esterificação Química

3.1.1 Caracterização da amostra

Numa primeira fase do trabalho, procedeu-se à caracterização da matéria-prima (neste caso, o óleo de peixe) avaliando parâmetros como a viscosidade cinemática, a massa volúmica, o índice de iodo (medida do grau de insaturação química), o índice de acidez (medida do teor de ácidos gordos livres) e ainda o teor de humidade. O cálculo destes parâmetros é a seguir descrito em detalhe.

A amostra de 1 kg de óleo de peixe, composta por uma mistura de 70 % atum e 30 % sardinha, foi processada e recolhida na empresa em 24 de Julho de 2015, e caracterizada previamente à esterificação química em 16 de Outubro de 2015 (Figura 4).

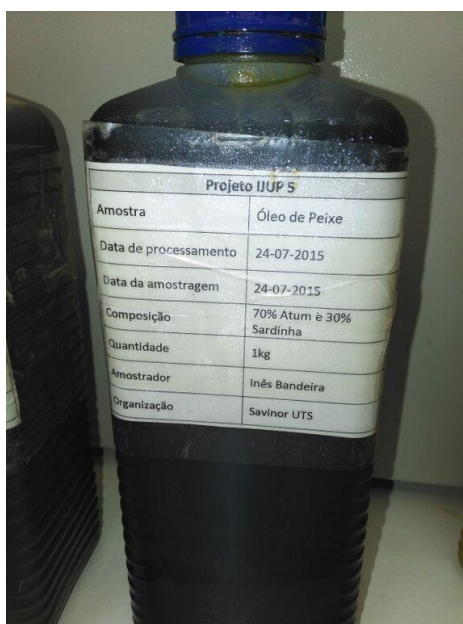


Figura 4 - Amostra de óleo de peixe composta por atum (70%) e sardinha (30%).

3.1.1.1 Viscosidade cinemática

O cálculo da viscosidade cinemática baseou-se na Norma Internacional ISO 3105:2001, utilizando-se o viscosímetro capilar de vidro de Cannon-Fenske Nº 200 calibrado, à temperatura de 40 °C. Todas as determinações de viscosidade foram feitas em triplicado até tempo constante e depois foi feita a média dos 3 valores. Para se efetuar cada um dos ensaios, aqueceu-se previamente a amostra até à temperatura de referência e pipetou-se um volume aproximado de 10 mL óleo de peixe para o reservatório do viscosímetro contido num banho a

40 °C. Depois de se aguardar alguns minutos com o viscosímetro carregado para que a temperatura da amostra estabilizasse, aspirou-se a amostra no ramo do viscosímetro que continha o tubo capilar, até que esta passasse cerca de 7 mm o traço de referência superior. Por ação da gravidade, deixou-se a amostra escoar no viscosímetro e cronometrou-se o tempo que esta demorou a passar entre as duas linhas de referência (Figura 5).

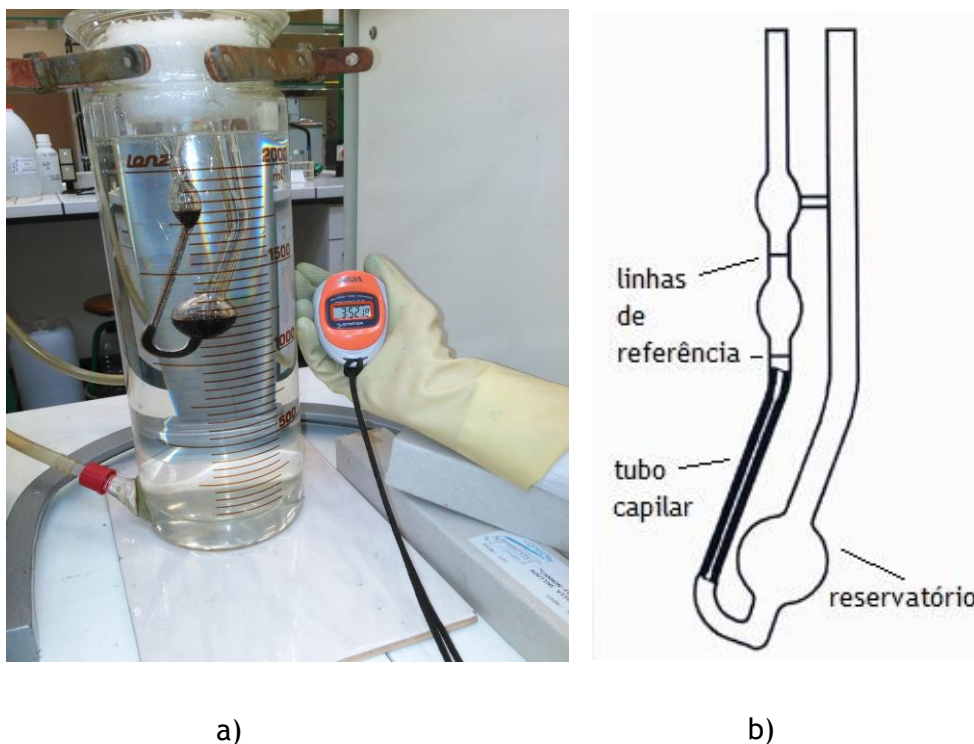


Figura 5 - a) Determinação da viscosidade cinemática; b) Viscosímetro de Cannon-Fenske.

Após ter-se obtido o tempo de escoamento, a viscosidade cinemática foi determinada de acordo com a Equação 1:

$$\nu = K \times (t - G) \quad (1)$$

em que ν representa a viscosidade cinemática a 40 °C (mm²/s), K a constante do viscosímetro para a temperatura referida, t o tempo de escoamento (s) e G o fator de correlação para o viscosímetro, o qual toma o valor de zero para tempos de escoamento superiores a 280 s e varia conforme o viscosímetro usado.

3.1.1.2 Massa volúmica

A massa volúmica da amostra foi determinada à temperatura ambiente (20 °C) e de acordo com a Norma Portuguesa NP 938:1988, uma vez que o óleo de peixe se encontrava no estado líquido a essa mesma temperatura.

Para a sua determinação pesou-se, numa primeira fase, um picnómetro vazio com cerca de 25 cm³ de capacidade e, de seguida, encheu-se com água destilada e procedeu-se a uma nova

pesagem. Depois de rejeitada a água e o picnómetro devidamente seco, voltou-se a pesar, desta vez com o picnómetro cheio de óleo de peixe, que foi previamente homogeneizado. A Figura 6 ilustra as 3 etapas deste procedimento.

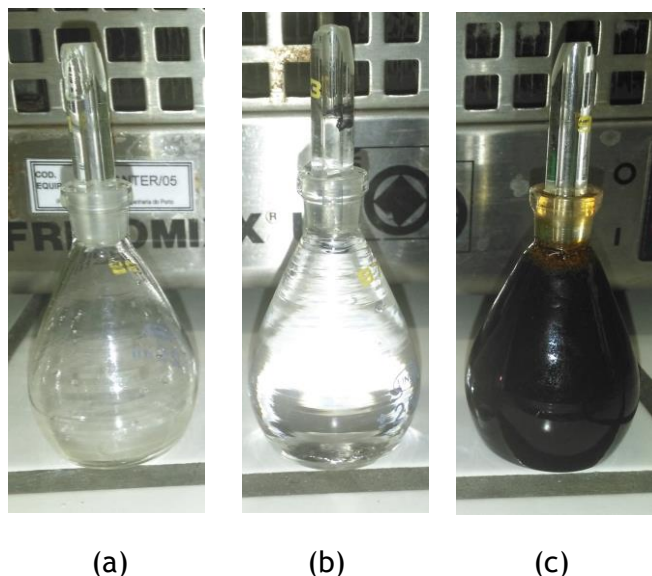


Figura 6 - a) Picnómetro vazio; b) Picnómetro com água destilada; c) Picnómetro com óleo de peixe.

Depois de registados os valores referidos no parágrafo anterior, através da Equação 2, calculou-se a massa volúmica do óleo:

$$\rho_t = \frac{m_3 - m_1 + A}{V_t} \quad (2)$$

em que ρ_t representa a massa volúmica do óleo à temperatura t de referência (g/cm^3), m_3 a massa do picnómetro com o óleo (g), m_1 a massa do picnómetro vazio (g), A a impulsão aproximada sofrida no ambiente da balança pelo conteúdo do picnómetro (g) e V_t a capacidade do picnómetro à temperatura t de referência (cm^3). Para o cálculo destes últimos dois parâmetros, foi necessário recorrer às Equações 3 e 4 respetivamente.

$$A = 0,0012 \times (m_2 - m_1) \quad (3)$$

$$V_t = \frac{m_2 - m_1 + A}{\rho_{(H_2O)t}} \quad (4)$$

em que m_2 representa a massa do picnómetro com água destilada (g) e $\rho_{(H_2O)t}$ a massa volúmica da água à temperatura t de referência.

3.1.1.3 Índice de iodo

A determinação do índice de iodo foi feita de acordo com a Norma Portuguesa NP EN 14111:2009.

Para tal, pesou-se uma massa aproximada de 0,15 g de óleo de peixe para um frasco de vidro escuro com capacidade para 500 mL, à qual se adicionou 20 mL de solvente, composto por mistura de volumes iguais de ciclohexano e ácido acético glacial e 25 mL de reagente de Wijs, monoclóreto de iodo em ácido acético (0,1 mol/L). Fez-se também um ensaio padrão (branco), que continha o solvente e o reagente descritos anteriormente, mas omitindo a toma de amostra (Figura 7).



Figura 7 - Ensaio feito com e sem toma de amostra.

Os frascos, devidamente rolhados e agitados, foram deixados no escuro durante cerca de 1 h. No final deste tempo, verteu-se o conteúdo dos frascos para um matraz e adicionou-se ainda 20 mL de solução de iodeto de potássio (100 g/L) e 150 mL de água. No final, adicionaram-se 8 gotas de indicador de amido, e, sob agitação vigorosa, procedeu-se à titulação de cada um dos matrizes usando como titulante solução padrão de tiosulfato de sódio (0,1 mol/L) até que a cor tijolo dar origem a um branco leitoso, tal como se verifica na Figura 8:

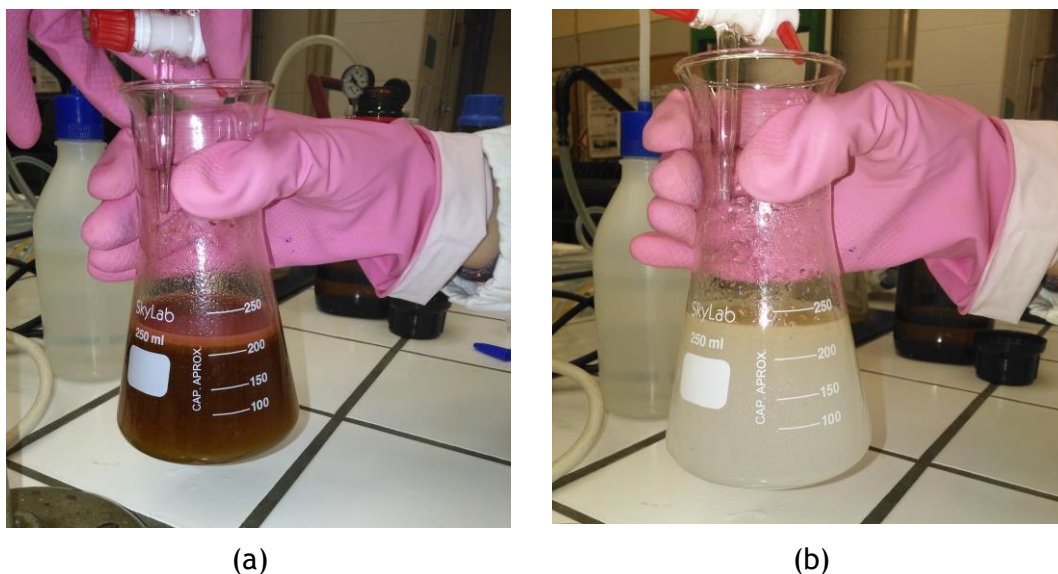


Figura 8 - Determinação do índice de iodo: a) antes da titulação; b) depois da titulação.

Depois dos volumes determinados, calculou-se o índice de iodo da amostra de óleo a partir da Equação 5:

$$WI = \frac{12,69 \times c \times (V1 - V2)}{m} \quad (5)$$

em que *WI* representa o índice de iodo (g iodo/100g de amostra), *c* a concentração da solução volumétrica padrão de tiosulfato de sódio utilizada (mol/L), *V1* o volume da solução volumétrica padrão de tiosulfato de sódio utilizado na titulação do branco (mL), *V2* o volume da solução volumétrica padrão de tiosulfato de sódio utilizado na titulação da amostra (mL) e *m* a massa da toma de amostra (g).

3.1.1.4 Índice de acidez

A determinação do índice de acidez (IA) foi uma das caracterizações mais importantes do trabalho, uma vez que a partir deste parâmetro, medido inúmeras vezes durante toda a experiência, foi possível através de vários ajustes, aferir quais as melhores condições que favorecem um IA mais baixo no final do tempo de reação. O índice de acidez da amostra foi medido tendo por base a Norma Portuguesa NP EN 14104:2011.

Numa primeira fase, preparou-se a solução titulante (solução alcoólica de KOH), dissolvendo cerca de 7 g de KOH em 1 L de etanol. Depois de a solução estar totalmente dissolvida, determinou-se a sua concentração (mol/L), pesando uma massa aproximada de 0,15 g de ácido benzóico e dissolvendo-a em 50 mL de 4-metilpentan-2-ona, titulando-se em seguida com essa mesma solução. Recorreu-se à Equação 6 para determinar a concentração da solução:

$$C_{KOH\text{ alcoólica}} = \frac{1000 \times m_0}{122,1 \times V_0} \quad (6)$$

em que m_0 corresponde à massa de ácido benzoico (g) e V_0 o volume da solução de KOH gasta na titulação.

Em seguida, pesou-se cerca de 5 g de gordura para um matraz, ao qual se adicionaram 25 mL de mistura equimolar de solvente (éter dietílico 95% + etanol 95%), após neutralização prévia com solução alcoólica de KOH, e 10 gotas de fenolftaleína. De seguida titulou-se com a solução de KOH, até a cor de tijolo dar lugar a um tom avermelhado, e calculou-se o índice de acidez através da Equação 7:

$$IA = \frac{56,1 \times V \times c}{m} \quad (7)$$

onde IA representa o índice de acidez (mg KOH/g amostra), V o volume da solução padrão de KOH utilizada (mL), c a concentração da solução padrão de KOH (mol/L) e m a massa da toma de amostra (g).

A Figura 9 ilustra o procedimento adotado para a determinação do índice de acidez.

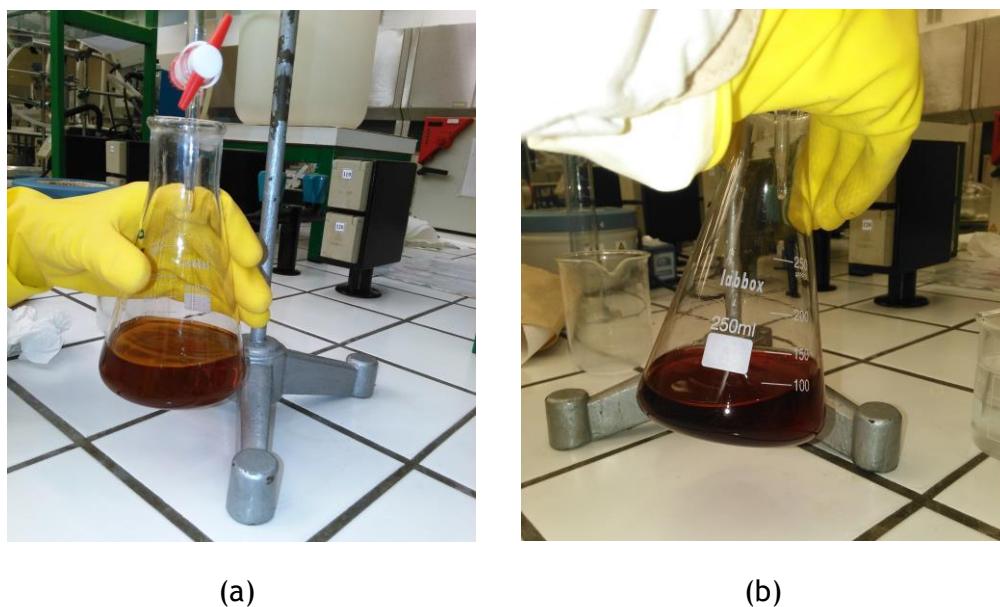


Figura 9 - Determinação do índice de acidez: a) antes do ponto de equivalência; b) depois do ponto de equivalência.

3.1.1.5 Teor de humidade

O teor de água foi determinado por titulação de Karl Fischer (Figura 10), cujos resultados foram obtidos em percentagem mássica.



Figura 10 - Equipamento utilizado para determinar o teor de humidade (Karl Fischer).

3.1.2 **Procedimento experimental para a esterificação química**

Para dar início à reação de esterificação química do óleo de peixe, pesaram-se 12 frascos contendo aproximadamente 5 g de gordura previamente homogeneizada em cada um (Figura 11), aos quais se adicionou a massa de reagente (metanol) e catalisador (ácido sulfúrico concentrado) necessária para que a reação se concretizasse. É de salientar que a quantidade de metanol e ácido sulfúrico adicionada a cada frasco é função do índice de acidez inicial, sendo este um parâmetro fundamental a ser medido antes de cada esterificação.



Figura 11 - Amostras de óleo de peixe para reação de esterificação por via química.

Seguidamente, as amostras foram colocadas num banho termostático à temperatura de 60°C e sob agitação mínima de 60 rpm, para garantir uma temperatura homogênea ao longo de todo o banho. O tempo de reação considerado para a esterificação química foi de 2 h, ao longo das quais foram retirados, periodicamente, os frascos de reação de modo a obter-se nos resultados uma curva que caracterizasse a variação do índice de acidez ao longo do tempo. Depois de cada frasco ser retirado do banho, o seu conteúdo foi vertido para uma ampola de decantação e lavado com água quente (> 80 °C), agitou-se e aguardaram-se alguns minutos para que se desse a separação de fases. Deste modo, obteve-se na parte inferior da ampola de decantação a fase aquosa, que arrastou consigo o metanol e o ácido sulfúrico, e na parte superior, o óleo de peixe que reagiu (Figura 12).



Figura 12 - Lavagem do óleo esterificado.

Para cada frasco de reação foram feitas no mínimo três lavagens, para que o catalisador ácido saísse na totalidade. Para garantir isso, foi-se medindo o pH da água de lavagem através de papel indicador, até se obter um pH neutro, tal como se observa na Figura 13.



Figura 13 - pH da água de lavagem medido ao longo do tempo.

No fim das lavagens, o óleo esterificado foi vertido para um matraz e foi medido o respetivo o índice de acidez (Figura 14), tal como descrito anteriormente, e cujos resultados se encontram no capítulo seguinte.



(a)



(b)

Figura 14 - Determinação do índice de acidez: (a) antes e (b) depois da titulação, respetivamente.

3.2 Esterificação Enzimática

3.2.1 Caracterização das amostras

Numa fase inicial da esterificação enzimática, procedeu-se à caracterização do óleo de peixe, tal como no caso da esterificação química, avaliando igualmente a viscosidade cinemática, a massa volúmica, o índice de iodo, o índice de acidez e o teor de humidade. Os protocolos adotados para a determinação destes parâmetros foram descritos no sub-capítulo anterior.

No caso da esterificação enzimática foram utilizadas duas amostras de óleo de peixe (Figura 15), uma vez que a quantidade que se dispunha de uma só amostra não era suficiente para realizar todos os ensaios necessários.

A primeira amostra, recolhida na empresa em 14 de Agosto de 2015 e caracterizada em 18 de Novembro de 2015, tratava-se de uma mistura composta por 80 % de atum e 20 % de outros peixes (sardinha, bacalhau e peixe congelado incluindo pequenas quantidades de bacalhau, redfish, tiras de pele de tubarão, posta de peixe de variadas espécies, marisco, moluscos, etc.).

A segunda amostra, recolhida na empresa em 8 de Setembro de 2015 e caracterizada em 4 de Dezembro de 2015, continha uma mistura formada por 63,5 % de atum, 25,9 % de peixe fresco de conserveiras (incluindo sardinha, atum e cavala), 2,7 % de peixe congelado (bacalhau, redfish, tiras de pele de tubarão, posta de peixe de variadas espécies, marisco, moluscos, etc.) e 5,5 % de bacalhau.

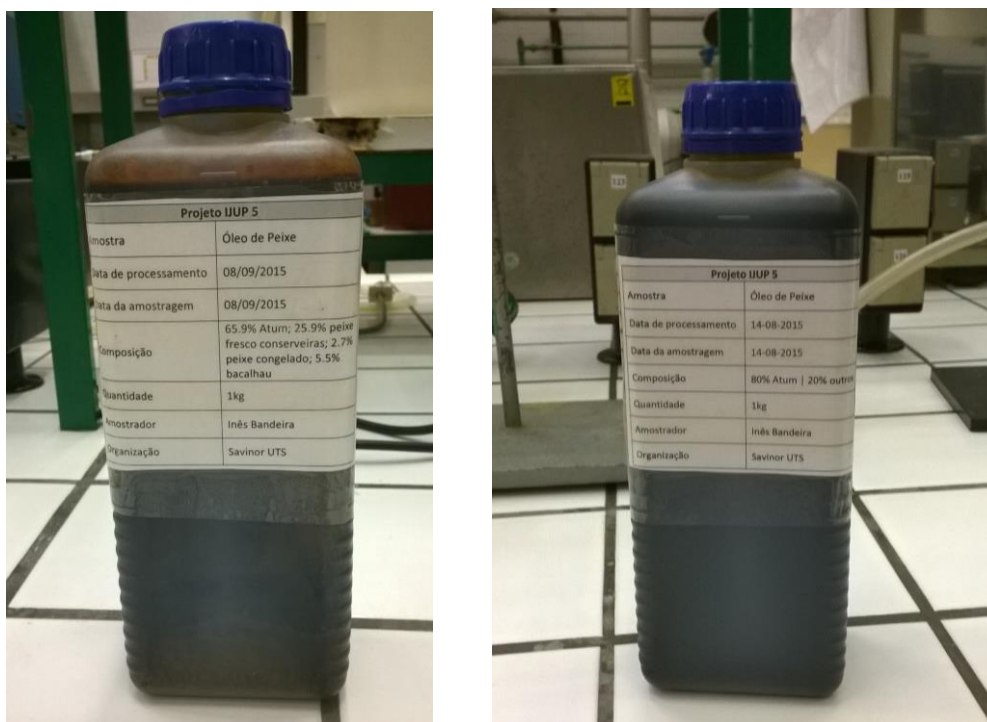


Figura 15 - Amostras de óleo de peixe utilizadas na esterificação enzimática.

3.2.2 Escolha da melhor enzima

Depois das amostras estarem devidamente caracterizadas, procedeu-se à escolha da enzima que mais se adequasse ao objetivo pretendido, ou seja, a enzima que funcionasse como melhor catalisador na reação de esterificação dos ácidos gordos livres do óleo de peixe e assim permitisse atingir um índice de acidez mais reduzido. Para tal, da variedade de enzimas disponíveis no laboratório e tendo em conta as enzimas que eram mais usadas na literatura para efeitos de esterificação enzimática de gorduras animais, escolheram-se quatro espécies, Palatase 20000L, Lipozyme CALB L, Lipozyme RM IM e Novozym 435, estando as duas primeiras no estado líquido e as outras duas no estado sólido (Figura 16):



Figura 16 - Enzimas Palatase 20000L, Lipozyme CALB L, Lipozyme RM IM e Novozym 435.

Assim sendo, tendo em conta as diferentes atividades enzimáticas, calculou-se a quantidade de enzima necessária para reagir com uma determinada massa de óleo (5 g), assim como a quantidade de etanol para o mesmo efeito. O óleo de peixe, o reagente e o catalisador foram colocados em frascos de reação e mergulhados num banho termostático a 45°C com agitação magnética e deixados a reagir durante 3 h, ao fim das quais se fizeram as lavagens com água quente e se mediu o índice de acidez. Depois de aferir quais as melhores duas enzimas de entre as quatro disponíveis, fez-se um novo teste, desta vez realizando dois ensaios com cada enzima a tempos de reação diferentes (1 h:30 min e 3 h, respetivamente) a fim de corroborar os ensaios anteriores e certificar que a escolha da enzima para avançar com as restantes experiências era a mais adequada.

3.2.3 Procedimento experimental para a esterificação enzimática

Após a escolha da enzima adequada, foram realizadas várias experiências, variando diferentes parâmetros, para se avaliar quais as condições ótimas para a obtenção de um índice de acidez mais baixo. O tempo de reação considerado foi de 3 h para todas os ensaios e foram variados os seguintes parâmetros: temperatura de reação, razão mássica enzima/óleo, razão mássica

álcool/AGL e tipo de álcool. Note-se que, tal como para a esterificação química, a quantidade de álcool adicionada como reagente foi calculada em função do índice de acidez inicial da amostra (3,14 g etanol/g AGL, m/m) e com base neste valor obtido testaram-se outras quantidades de etanol (o dobro do álcool e cerca de 50 % acima do valor calculado). Todas as experiências foram realizadas em duplicado e feita a média dos dois valores.

3.2.3.1 Ensaio padrão

Este foi o primeiro teste realizado e serviu como base de comparação. Para tal, pesaram-se 8 frascos em que se colocaram aproximadamente 10 g de gordura previamente homogeneizada, aos quais se adicionou a massa de etanol e de enzima (Lipozyme CALB L) necessária para que a reação se realizasse.

Os frascos de reação foram então imersos num banho termostático a 45 °C com agitação magnética e deixados a reagir (Figura 17).



Figura 17 - Banho termostático com agitação magnética.

Ao longo do tempo de reação, foram sendo retirados os frascos com o óleo esterificado e seguidamente efectuadas as lavagens, tal como no processo químico (Figura 18). No final das lavagens, mediu-se o índice de acidez correspondente.



Figura 18 - Lavagem do óleo de peixe após esterificação enzimática.

3.2.3.2 Variação da temperatura de reação

Procedeu-se de igual forma que no ensaio anterior, tendo-se testado as temperaturas do banho a 35 °C, 40 °C e a 55 °C.

3.2.3.3 Variação da razão mássica enzima/óleo

Neste ensaio, alterou-se a quantidade de enzima adicionada à toma de amostra, tendo-se aumentado esta para o dobro (0,0045 m/m) e mantendo os outros parâmetros inalterados.

3.2.3.4 Variação da razão mássica álcool/AGL

De igual modo ao caso anterior, alterou-se a quantidade de álcool adicionada à toma de amostra, tendo-se aumentado esta para o dobro (de 3,235 para 6,566 g etanol/g AGL, m/m) e, posteriormente, aumentando também para mais 50 % (4,907 m/m) mantendo os outros parâmetros inalterados.

3.2.3.5 Variação do tipo de álcool

Esta experiência executou-se da mesma maneira que o ensaio padrão, tendo-se substituído o álcool utilizado (etanol) por butanol.

3.2.3.6 Ensaio final – Melhores condições operacionais

No final das diferentes variações dos parâmetros descritos anteriormente, foi feito um ensaio que reunia as condições que levaram a uma maior redução do índice de acidez inicial.

4 Resultados e Discussão

4.1 Esterificação Química

4.1.1 Caracterização da amostra

Na Tabela 2 encontram-se presentes as propriedades avaliadas na caracterização do óleo de peixe utilizado na reação de esterificação química.

Tabela 2 - Propriedades do óleo de peixe para esterificação química.

Propriedade	Composição do óleo: 70% atum + 30% sardinha
Viscosidade cinemática a 40 °C (mm ² /s)	32,17
Massa volúmica a 20 °C (kg/m ³)	940
Índice de iodo (g iodo/100 g _{amostra})	219
Índice de acidez inicial (mg KOH/g _{amostra})	11,17
Teor de humidade (% m/m)	0,4966

Verifica-se que o índice de acidez do óleo da SAVINOR é bastante elevado assim como o índice de iodo e a viscosidade. Isto deve-se, essencialmente, ao tempo e condições de armazenamento.

4.1.2 Reação de esterificação química

A partir do índice de acidez inicial, estudou-se então a variação desse parâmetro ao longo do tempo, para o processo de esterificação química, à temperatura de 60 °C e sob agitação de 60 rpm, com uma razão mássica catalisador/óleo de 0,003 m/m e uma razão mássica de álcool/AGL de 2,235 m/m (Figura 19). Foi feito um duplicado do ensaio, de forma a corroborar o ensaio que se segue, que se encontra no Anexo 1.

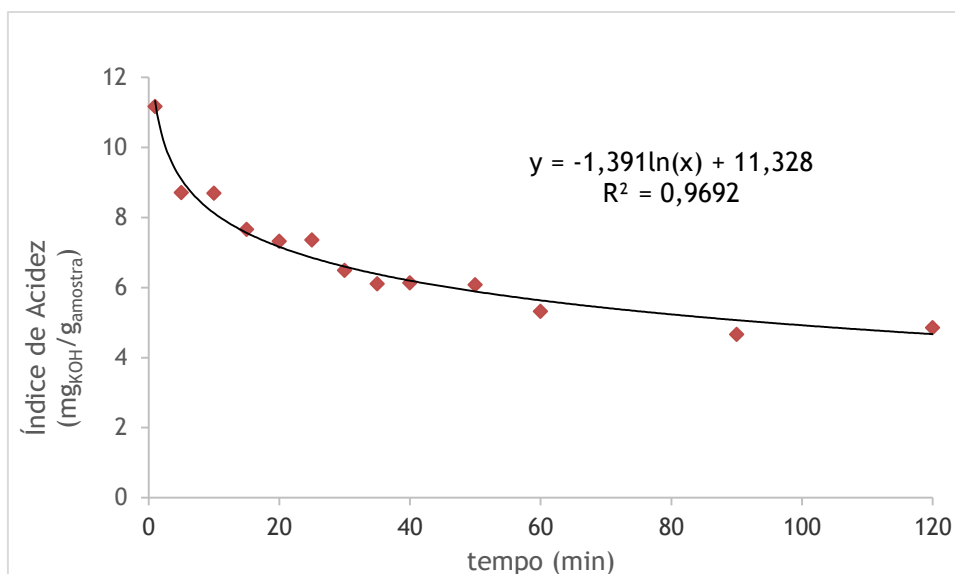


Figura 19 - Variação do índice de acidez em função do tempo a $T=60\text{ }^{\circ}\text{C}$ e 60 rpm, com uma razão catalisador/óleo de 0,003 m/m e uma razão mássica de álcool/AGL de 2,235 m/m.

Através da visualização gráfica pode concluir-se que a esterificação química a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ foi bastante satisfatória já que se observa uma diminuição do índice de acidez de cerca de 50 % relativamente ao valor inicial, ou seja, a acidez da matéria-prima diminuiu ao longo do tempo de esterificação. O aumento do tempo de reação além de 1 h não tem um efeito significativo na redução do índice de acidez, o que se verifica pois o valor do índice de acidez praticamente estabiliza a partir dos 60 min. Isto acontece porque a partir desse tempo ocorre uma inibição da reação devido à formação de água durante a esterificação.

4.2 Esterificação Enzimática

4.2.1 Caracterização das amostras

Na Tabela 3 encontram-se presentes as propriedades avaliadas na caracterização de 2 óleos de peixe utilizado na reação de esterificação enzimática. Um dos óleos com 80 % atum e 20 % de outros peixes e o outro óleo com 63,5 % atum + 25,9 % peixe fresco de conserveiras + 2,7 % peixe congelado + 5,5 % bacalhau.

Tabela 3 - Propriedades do óleo de peixe utilizado para a esterificação enzimática.

Propriedades	Composição do óleo: 80 % atum + 20 % de outros peixes	Composição do óleo: 63,5 % atum + 25,9 % peixe fresco de conserveiras + 2,7 % peixe congelado + 5,5 % bacalhau.	
Viscosidade cinemática a 40 °C (mm ² /s)		34,74	34,03
Massa volúmica a 20 °C (kg/m ³)		937	937
Índice de iodo (g iodo/100 g _{amostra})		146	200
Índice de acidez inicial (mg KOH/g _{amostra})		10,05	11,94
Teor de humidade (% m/m)		0,5106	1,821

Verifica-se que o índice de acidez de ambos os óleos é igualmente elevado. Embora tenham composições muito distintas, as duas amostras apresentam a mesma densidade e aproximadamente a mesma viscosidade, diferindo no teor de humidade, em que a segunda amostra apresenta mais do dobro do teor de humidade da primeira, não obdecendo aos limites impostos pela Savinor (máx. 1 %). Também no índice de iodo existem diferenças significativas entre os dois óleos, o que indica um grau de insaturação química mais elevado na segunda amostra, provavelmente devido à mistura complexa de vários peixes. Aquando da medição do índice de acidez inicial, verificou-se que a acidez das duas amostras se encontrava dentro dos limites impostos pela empresa (máx. 6 % de acidez ou 12 mg KOH/g_{amostra} de índice de acidez).

4.2.2 Escolha da melhor enzima

Na Tabela 4 encontram-se os resultados relativos à escolha da melhor enzima, onde estão representados os índices de acidez obtidos após 3 h de esterificação. No teste das várias enzimas, a amostra partia de um índice de acidez inicial de 10,05 mg KOH/ g_{amostra}.

Tabela 4 - Índices de acidez ao fim de 3 h para as várias enzimas testadas.

Enzima	m _{amostra} (g)	V _{titulante} (mL)	IA final (mg KOH/ g _{amostra})	IA final médio (mg KOH/ g _{amostra})
Lipozyme RM IM	2,52	3,1	4,25	4,30
	2,01	2,5	4,30	
Lipozyme CALB L	2,67	3,0	3,89	3,89
	2,22	2,5	3,89	
Palatase 20000 L	2,56	4,8	6,48	6,45
	2,48	4,6	6,41	
Novozym 435	2,91	4,6	5,47	5,51
	2,43	3,9	5,55	

Após a análise da tabela anterior, conclui-se que ao final das 3 h, as enzimas que levaram a uma maior redução do índice de acidez foram a Lipozyme RM IM e Lipozyme CALB L, tendo-se obtido uma diminuição de 57,43 % e 61,29 % comparativamente ao valor inicial. Ainda que os resultados fossem relativamente claros, foi feito ainda um segundo ensaio testando as duas enzimas referidas anteriormente, de modo a confirmar os resultados, desta usando tempos de reação de 1 h:30 min e 3 h. Os resultados são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Índices de acidez ao fim de 1 h:30 min e 3 h, usando as enzimas Lipozyme RM IM e Lipozyme CALB L.

Enzima	m _{amostra} (g)		V _{titulante} (mL)	IA final (mg KOH/ g _{amostra})	IA final médio (mg KOH/ g _{amostra})
Lipozyme RM IM	1 h:30 min	2,82	5,2	6,38	6,40
		2,37	4,4	6,42	
	3 h	2,53	3,2	4,37	4,34
		2,17	2,7	4,30	
Lipozyme CALB L	1 h:30 min	2,54	5,1	6,94	6,97
		2,42	4,9	7,00	
	3 h	2,64	3,0	3,93	3,96
		2,78	3,2	3,98	

Os resultados da Tabela 5 confirmam o primeiro ensaio, pelo que a enzima que conduz a uma redução maior do índice de acidez no caso do óleo de peixe é a Lipozyme CALB L. No entanto, com este segundo ensaio em que foram retirados os frascos de reação a dois tempos diferentes, verificou-se que para tempos de reação mais curtos, a Lipozyme RM IM reage mais depressa e tem um efeito ligeiramente melhor na diminuição do índice de acidez, mas para o tempo de reação de 3 h, não reduz tanto a acidez como a Lipozyme CALB L, pelo que foi esta a enzima considerada como a mais adequada.

4.2.3 Reação de esterificação enzimática

Para cada variação, foi feito sempre um duplicado. Os duplicados de cada teste que se segue, podem ser consultados no Anexo 1. Os valores representados nos gráficos desta secção são a média das duas titulações efetuadas para cada ponto.

4.2.3.1 Ensaio padrão

Na Figura 20 está representado o gráfico da variação do índice de acidez em função do tempo para o ensaio base. Tal como foi dito no capítulo anterior, este ensaio serviu de termo de comparação para os testes que se seguem e assim facilitar a escolha das melhores condições para redução do índice de acidez do óleo de peixe. Este ensaio foi realizado à temperatura de 45 °C, onde cada frasco de reação continha 10 g de gordura, 2 mL de etanol (99,8% v/v) na

razão etanol/AGL de 3,14 m/m e 0,01922 mL de Lipozyme CALB L na razão enzima/óleo de 0,00225 m/m.

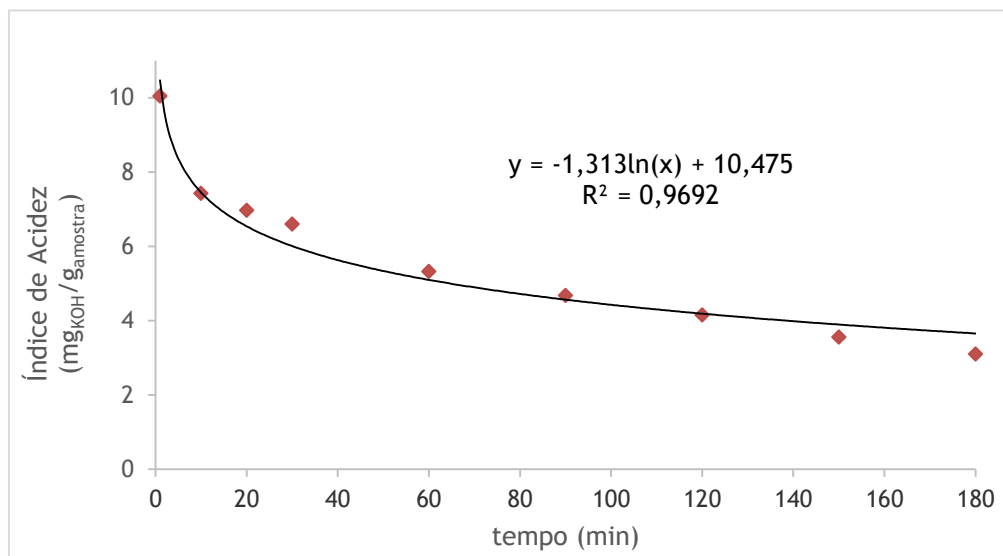


Figura 20 - Ensaio padrão da reação de esterificação enzimática: T=45 °C, na razão etanol/AGL de 3,14 m/m e na razão enzima/óleo de 0,00225 m/m.

Da figura anterior, conclui-se que as condições acima citadas conduziram a uma redução do índice de acidez de aproximadamente 69,11 % relativamente ao valor inicial.

4.2.3.2 Variação da temperatura de reação

Na Figura 21 está representado o gráfico da variação do índice de acidez em função do tempo à temperatura de 55 °C, onde cada frasco de reação continha 10 g de gordura, 2 mL de etanol (99,8% v/v) na razão etanol/AGL de 3,14 m/m e 0,01922 mL de Lipozyme CALB L na razão enzima/óleo de 0,00225 m/m.

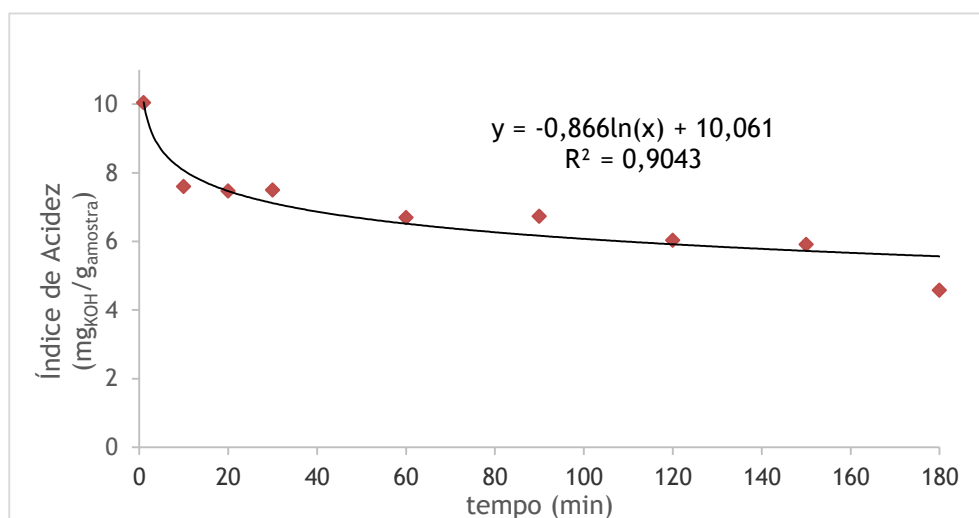


Figura 21 - Variação do índice de acidez em função do tempo a T=55 °C, na razão etanol/AGL de 3,14 m/m e na razão enzima/óleo de 0,00225

Na Figura 22 está representado o ensaio para a temperatura de 35 °C, onde cada frasco de reação continha 10 g de gordura, 2,3 mL de etanol (99,8% v/v) na razão etanol/AGL de 3,283 m/m e 0,01922 mL de Lipozyme CALB L na razão enzima/óleo de 0,00225 m/m. De notar que apenas se variou a temperatura de reação, as diferentes quantidades de etanol adicionadas justificam-se pelo facto da acidez se ter alterado (no ensaio a 55 °C o índice de acidez era aproximadamente 10,05 mg KOH/g_{amostra} ao passo que no ensaio a 35 °C este já se tinha alterado para 11,21 mg KOH/g_{amostra}).

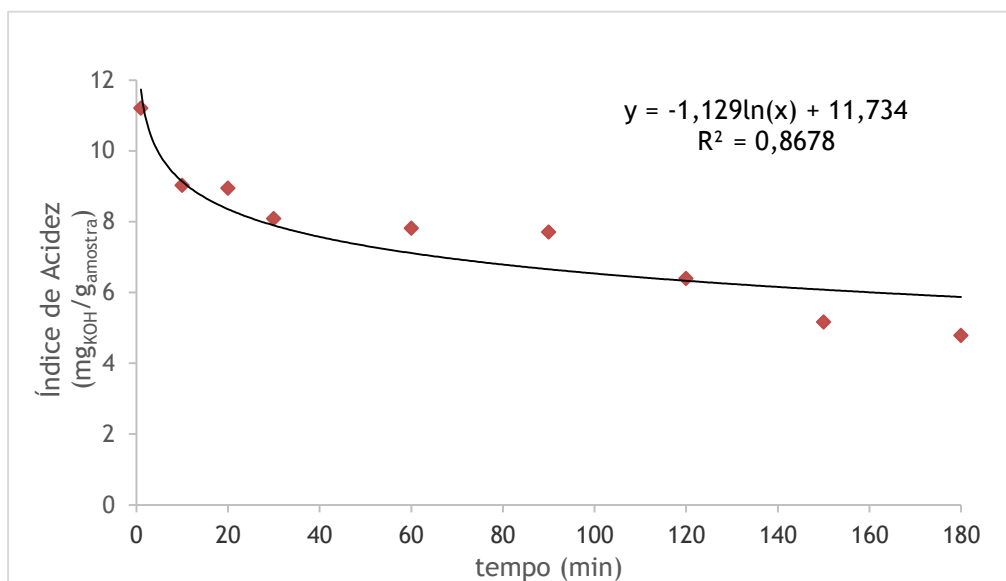


Figura 22 - Variação do índice de acidez em função do tempo a T=35 °C, na razão etanol/AGL de 3,283 m/m e na razão enzima/óleo de 0,00225 m/m.

Na Figura 23 está representado o ensaio para a temperatura de 40 °C, onde cada frasco de reação continha 10 g de gordura, 3,3 mL de etanol (99,8% v/v) na razão etanol/AGL de 3,238 m/m e 0,01922 mL de Lipozyme CALB L na razão enzima/óleo de 0,00225 m/m.

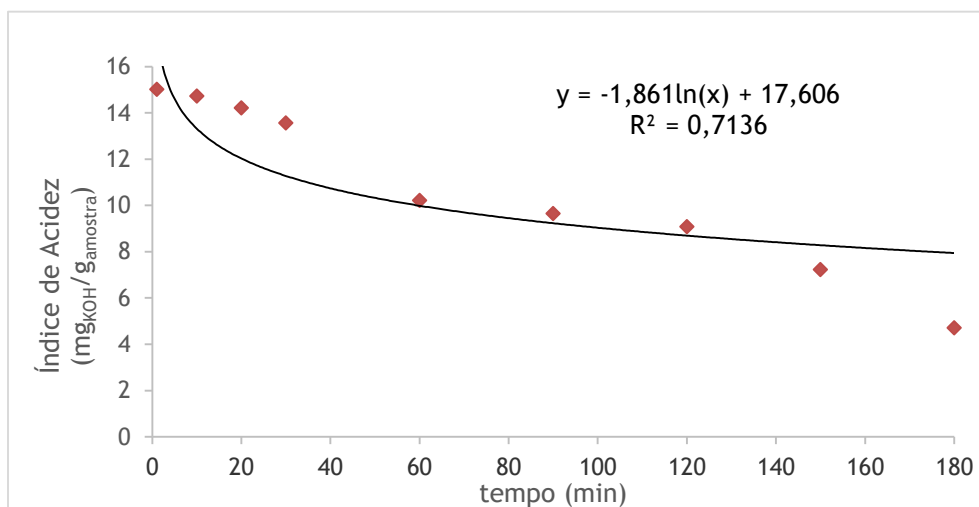


Figura 23 - Variação do índice de acidez em função do tempo a T=40 °C, na razão etanol/AGL de 3,238 m/m e na razão enzima/óleo de 0,00225 m/m.

Da análise dos gráficos, conclui-se que a temperatura que leva a uma maior redução da acidez do óleo de peixe é a temperatura de 45 °C, levando a uma diminuição do índice de acidez de 69,11 % relativamente ao valor inicial, ao passo que as temperaturas de 55 °C, 35 °C e 40 °C reduzem 54,44 %, 57,25 % e 68,71 % respetivamente. Colocando todas as temperaturas no mesmo gráfico (Figura 24), confirma-se o que foi dito anteriormente.

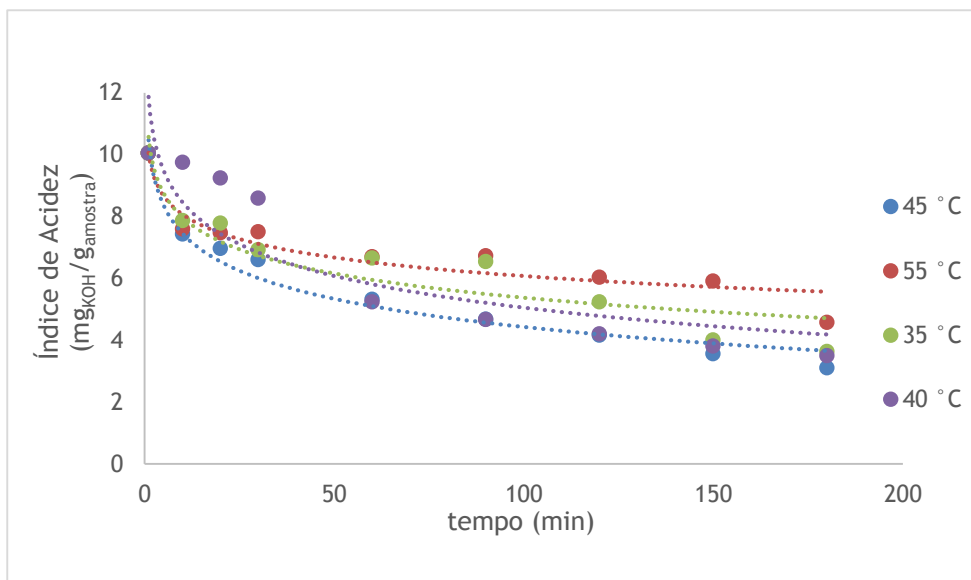


Figura 24 - Variação do índice de acidez em função do tempo para as diferentes temperaturas: 35 °C, 40 °C, 45 °C e 55 °C.

4.2.3.3 Variação da razão mássica enzima/óleo

Na Figura 25 está representado o gráfico da variação do índice de acidez em função do tempo à temperatura de 45 °C, onde cada frasco de reação continha 10 g de gordura, 2,3 mL de etanol (99,8% v/v) na razão etanol/AGL de 3,283 m/m e 0,03844 mL de Lipozyme CALB L, na razão enzima/óleo de 0,0045 m/m. A Figura 26 mostra a comparação entre a variação deste parâmetro e o ensaio padrão, cuja quantidade de enzima adicionada foi proporcional à toma de amostra considerada, ou seja, adição de álcool na razão etanol/AGL de 3,14 m/m e de enzima na razão enzima/óleo de 0,00225 m/m, à temperatura de 45 °C.

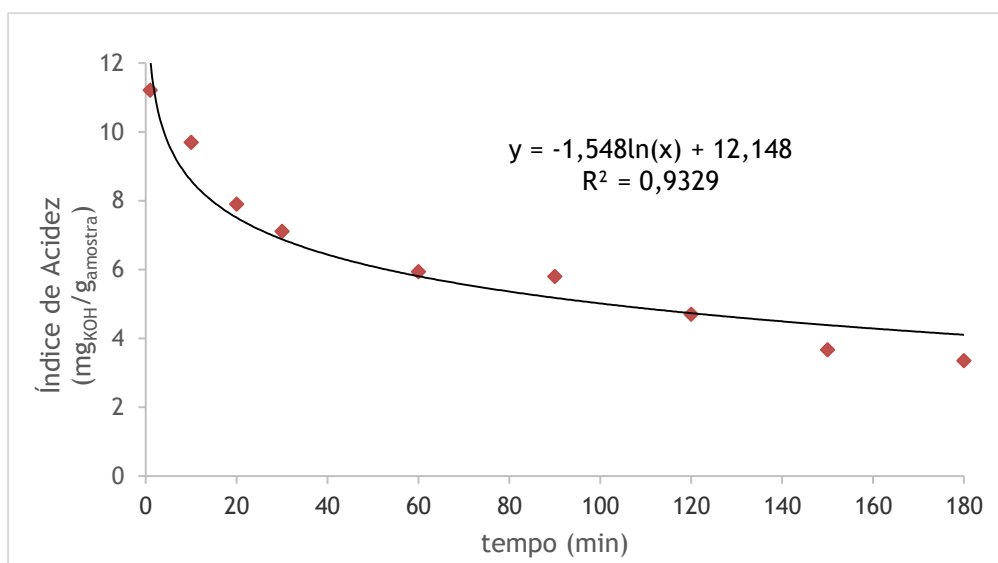


Figura 25 - Variação do índice de acidez em função do tempo a T=45 °C, na razão etanol/AGL de 3,283 m/m e na razão enzima/óleo de 0,0045 m/m.

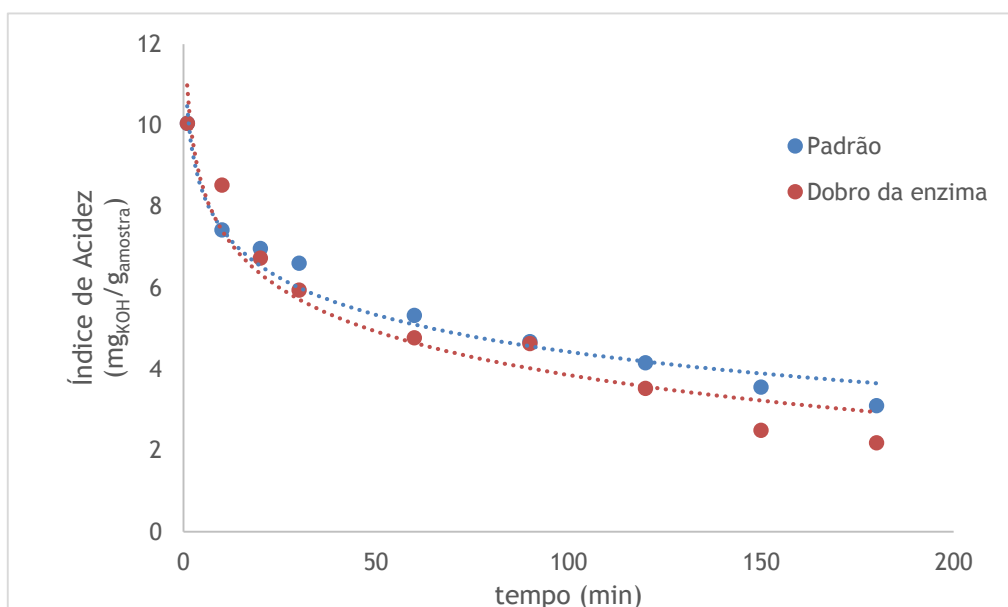


Figura 26 - Variação do índice de acidez em função do tempo para o ensaio padrão e para o ensaio com o dobro da enzima.

Por análise do gráfico da Figura 25 verifica-se que, adicionando o dobro da enzima necessária a reação é mais rápida conduzindo a uma redução do índice de acidez correspondente a 70,09 % relativamente ao valor inicial, sendo por isso uma melhor opção relativamente ao ensaio padrão. Esta conclusão é comprovada por análise da Figura 26, que compara os dois ensaios realizados.

4.2.3.4 Variação da razão mássica álcool/AGL

Na Figura 27 está representado o gráfico da variação do índice de acidez em função do tempo à temperatura de 45 °C, onde cada frasco de reação continha 10 g de gordura, 4,6 mL de etanol (99,8 % v/v), na razão etanol/AGL de 6,566 m/m e 0,01922 mL de Lipozyme CALB L, na razão enzima/óleo de 0,00225 m/m. A quantidade de álcool adicionada corresponde ao dobro da quantidade necessária para os AGL existentes na toma de óleo de 10 g.

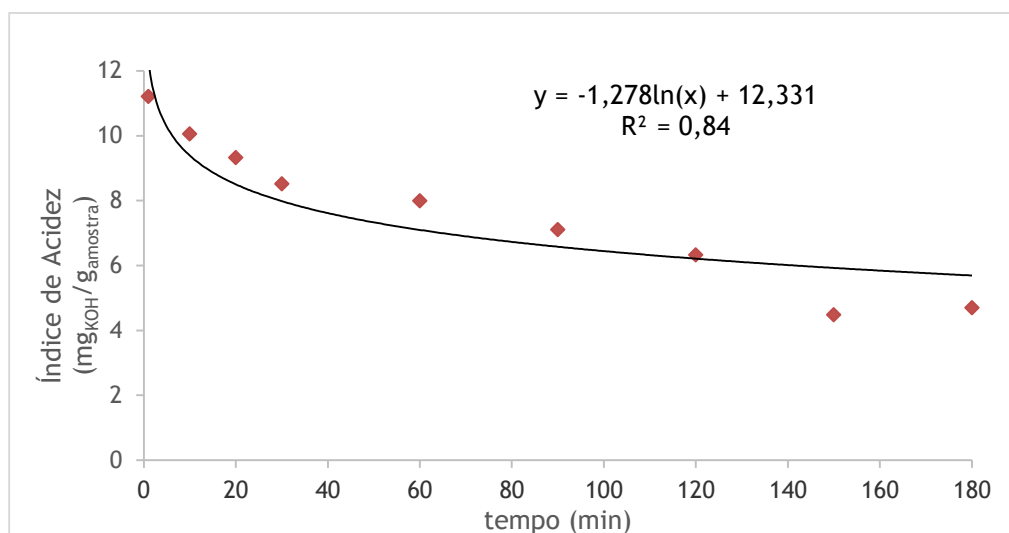


Figura 27 - Variação do índice de acidez em função do tempo a T=45 °C, na razão etanol/AGL de 6,566 m/m e na razão enzima/óleo de 0,00225 m/m.

Por sua vez, a Figura 28 mostra a comparação da variação da razão mássica álcool/AGL relativa ao ensaio padrão. No ensaio padrão, a razão mássica álcool/AGL usada foi de 3,14 m/m e neste ensaio a razão mássica etanol/AGL utilizada foi de 6,566 m/m. Ambos os ensaios foram realizados à temperatura de 45 °C.

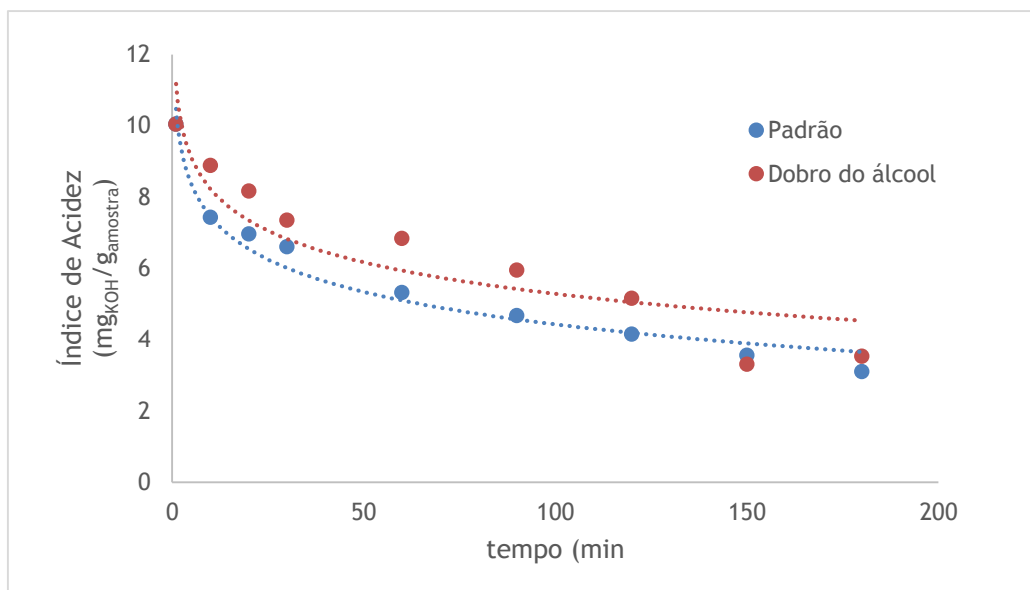


Figura 28 - Variação do índice de acidez em função do tempo para o ensaio padrão e para o ensaio com o dobro do álcool.

Como se pode observar nas duas figuras anteriores para efeitos de redução do índice de acidez, o aumento da quantidade de álcool tem um efeito prejudicial, sendo que utilizando o dobro da quantidade necessária para a toma da amostra deste reagente, faz com que o índice de acidez não diminua mais do que 58,07 % relativamente ao valor de início, podendo-se levar a concluir (erradamente, como vai ser explicado já a seguir) que adicionar a quantidade de álcool em proporção ao teor de AGL existentes no óleo é a opção mais adequada, tal como foi executado no ensaio padrão.

No entanto, efetuou-se mais um teste, em que em vez de se adicionar o dobro do álcool necessário, se adicionou apenas mais 50 %, isto é, 3,75 mL de etanol, na razão etanol/AGL de 4,907 m/m, juntamente com 10 g de gordura e 0,01922 mL de Lipozyme CALB L, na razão enzima/óleo de 0,00225. Os resultados podem ser analisados na Figura 29 e a comparação com o ensaio do dobro do álcool (razão etanol/AGL de 6,566 m/m e razão enzima/óleo de 0,00225) e o ensaio padrão (razão etanol/AGL de 3,14 m/m e razão enzima/óleo de 0,00225) pode ser estudada, tal como mostra a Figura 30.

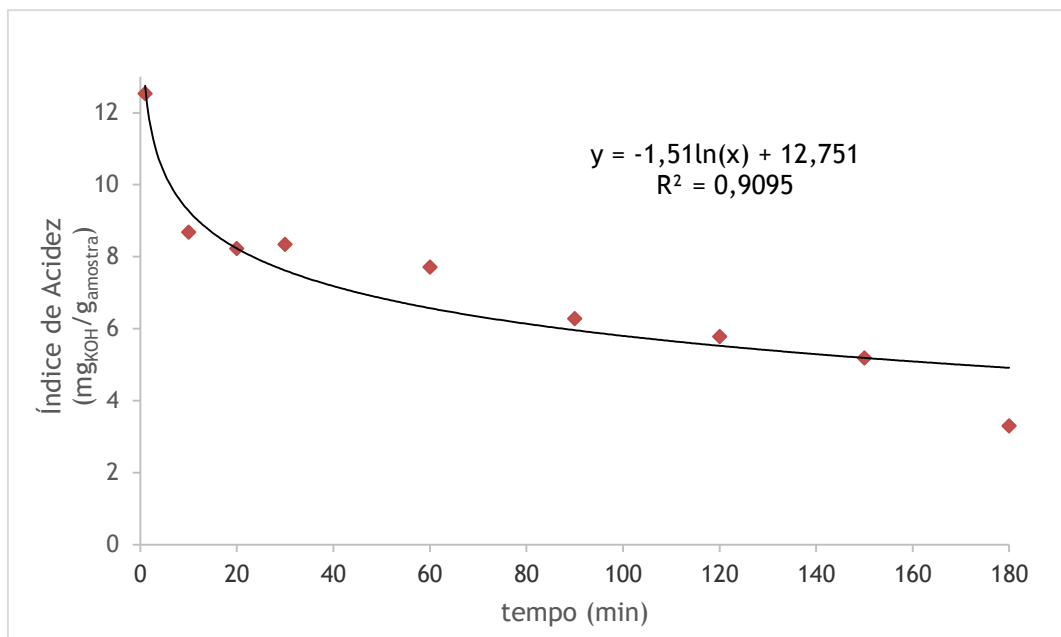


Figura 29 - Variação do índice de acidez em função do tempo a T=45°C, na razão etanol/AGL de 4,907 m/m e na razão enzima/óleo de 0,00225.

Da observação gráfica da Figura 29, conclui-se que um aumento de 50 % na quantidade de etanol adicionada conduz a uma redução do índice de acidez de cerca de 73,69 % relativamente ao valor inicial, sendo por isso uma melhor escolha do que usar apenas a quantidade de etanol em função do teor de AGL, tal como foi feito no ensaio padrão, ou o dobro da quantidade de álcool, como foi feito no ensaio anterior.

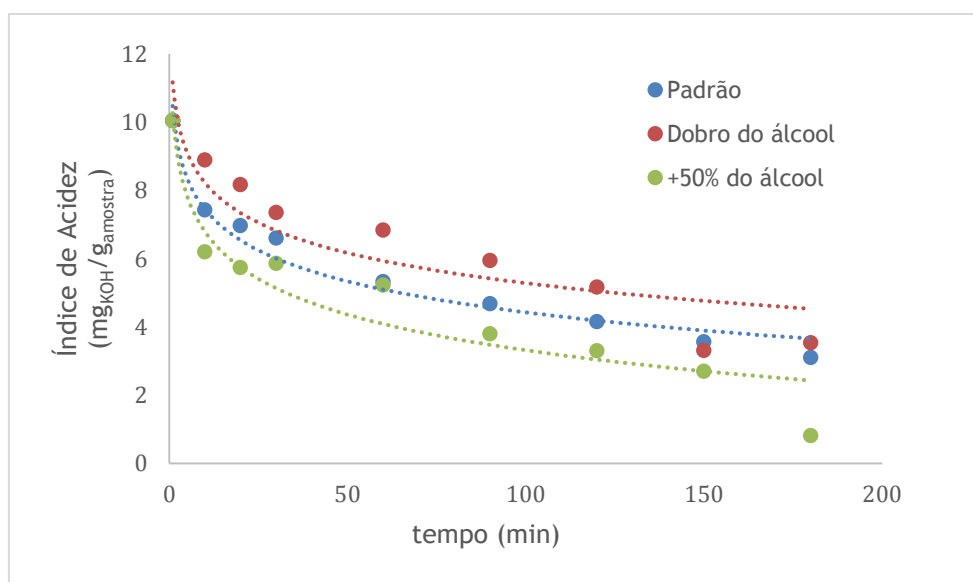


Figura 30 - Variação do índice de acidez em função do tempo para as diferentes quantidades de álcool adicionadas: padrão, dobro e +50 %.

4.2.3.5 Variação do tipo de álcool

Na Figura 31 está representado o gráfico da variação do índice de acidez em função do tempo à temperatura de 45 °C, onde cada frasco de reação continha 10 g de gordura, 3,5 mL de butanol, correspondendo a uma razão butanol/AGL de 5,13 m/m e 0,01922 mL de Lipozyme CALB L que corresponde a uma razão mássica enzima/óleo de 0,00225 m/m .

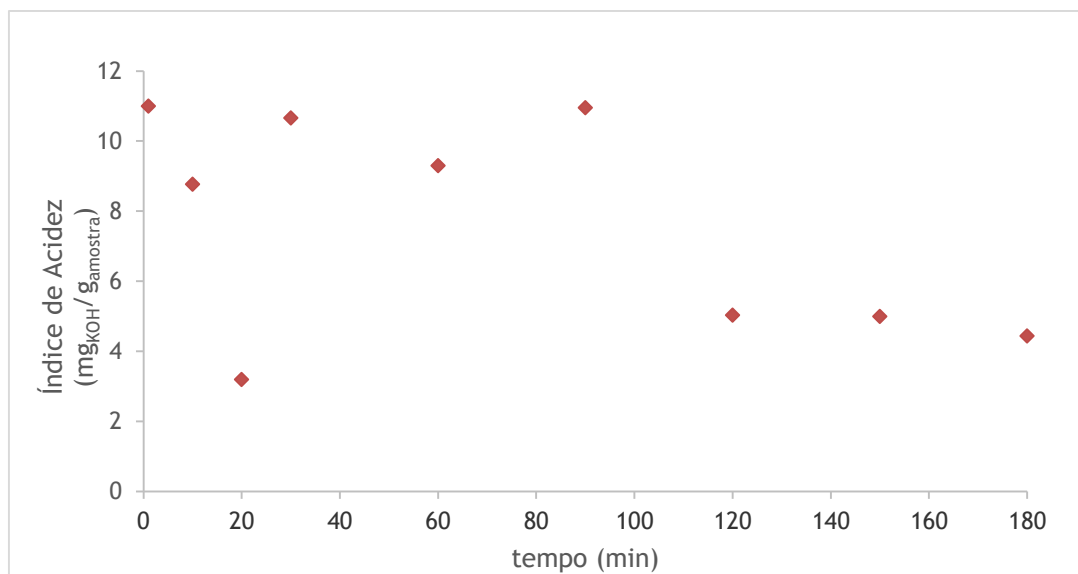


Figura 31 - Variação do índice de acidez em função do tempo a T=45 °C, na razão butanol/AGL de 5,13 m/m e na razão enzima/óleo de 0,00225 m/m .

Como se pode verificar através da análise da Figura 31, o ensaio com o butanol não deu resultados com lógica e não segue uma tendência. Este acontecimento é justificado pelo facto de, aquando das lavagens, o óleo esterificado com o butanol ter formado uma emulsão com a água, sendo impossível de separar, tal como mostra a Figura 32.



Figura 32 - Emulsão formada na lavagem do óleo esterificado com butanol.

A formação da emulsão gerada poderá ter origem em reações entre os contaminantes que existiam no óleo de peixe e o próprio álcool. Por este motivo, considerou-se o butanol como inadequado para a reação de esterificação enzimática com óleos de peixe.

4.2.3.6 Ensaio final – Melhores condições operacionais

Nesta última etapa do trabalho, foi possível a partir dos ensaios anteriores, escolher quais as melhores condições que conduziam a uma maior redução do índice de acidez do óleo de peixe. Com efeito e partindo de todas as análises precedentes, conclui-se que para as amostras estudadas, as melhores condições para a diminuição do índice acidez são as seguintes:

- Temperatura de reação: 45 °C;
- Razão mássica enzima/óleo: 0,0045 m/m;
- Razão mássica álcool/AGL: 4,879 m/m;
- Tipo de álcool: etanol 99,8 % v/v.

De salientar que a razão mássica álcool/enzima foi calculada em função do IA da amostra aquando do último ensaio (14,02 mg KOH/g_{amostra}); assim, as quantidades de enzima e álcool devem ser o dobro e + 50 % respetivamente, das necessárias para a toma de amostra de óleo de peixe de 10 g. Por observação gráfica dos resultados anteriores, também se pôde aferir um tempo médio de reação de 150 min, uma vez que não se observaram diferenças significativas nos últimos 30 min. Os resultados obtidos podem ser analisados na Figura 33.

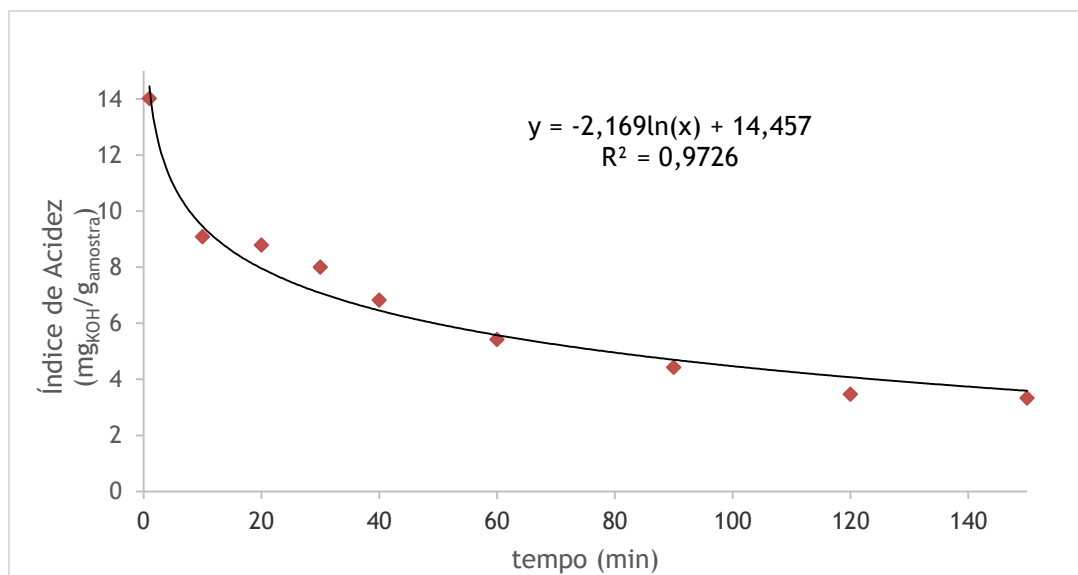


Figura 33 - Variação do índice de acidez em função do tempo a T= 45 °C, na razão etanol/AGL de 4,879 m/m e na razão enzima/óleo de 0,0045 m/m.

Reunindo as melhores condições operacionais, conclui-se que o índice de acidez sofreu uma redução de aproximadamente 76,3 % relativamente ao valor inicial, sendo assim um resultado bastante satisfatório e efetivamente o melhor resultado obtido neste estudo.

4.2.4 Cálculo da ordem de reação e da energia de ativação

Tomando como base o ensaio final, que reúne as melhores condições operacionais para a redução do índice de acidez do óleo de peixe, fizeram-se ajustes de modo a descobrir qual a ordem da reação da esterificação enzimática.

Numa primeira fase, fez-se corresponder o índice de acidez à concentração de ácido oleico - $C_{\text{ácido oleico}}$ (mol/L) - existente nos 10 g de óleo de peixe, através da expressão:

$$C_{\text{ácido oleico}} = \frac{\frac{IA}{1,99}}{\frac{282,4614}{V_{\text{amostra}}} \times \frac{10}{100}} \times 1000$$

onde IA corresponde ao índice de acidez em cada ponto (mg KOH/g_{amostra}) e V_{amostra} ao volume da amostra, dado pelo quociente entre a massa da toma e a massa volúmica da mesma.

Dividindo o IA por 1,99 obtém-se o valor da acidez (%) que corresponde à percentagem de AGL presente em 100 g de óleo, sendo 282,4614 g/mol a massa molecular do ácido oleico.

Seguidamente, fizeram-se as representações gráficas de $-\ln(C_{\text{ácido oleico}}/C_{\text{ácido oleico inicial}})$ em função do tempo (Figura 34) e $1/C_{\text{ácido oleico}}$ em função do tempo (Figura 35).

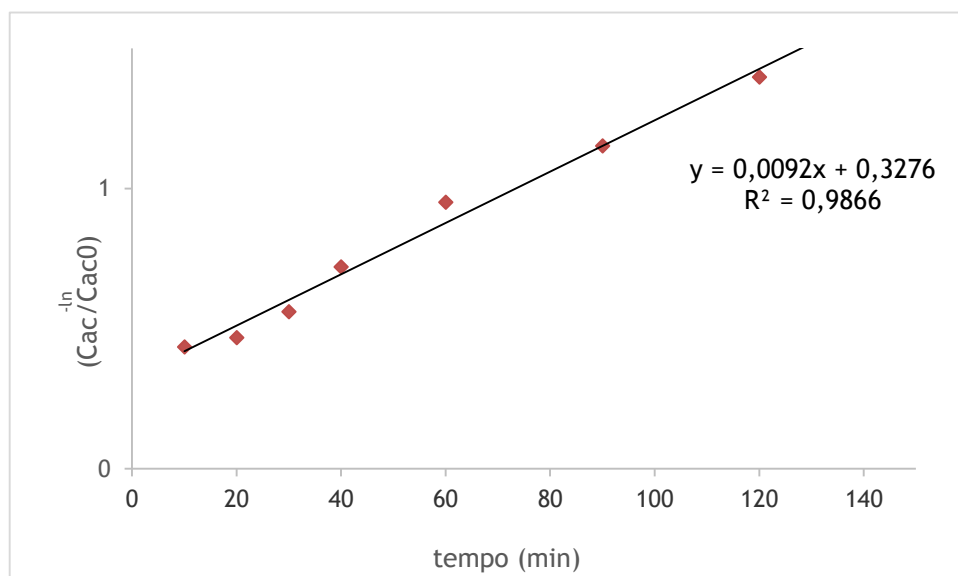


Figura 34 - Representação gráfica de $-\ln(C_{\text{ácido oleico}}/C_{\text{ácido oleico inicial}})$ em função do tempo - cinética de 1ª ordem.

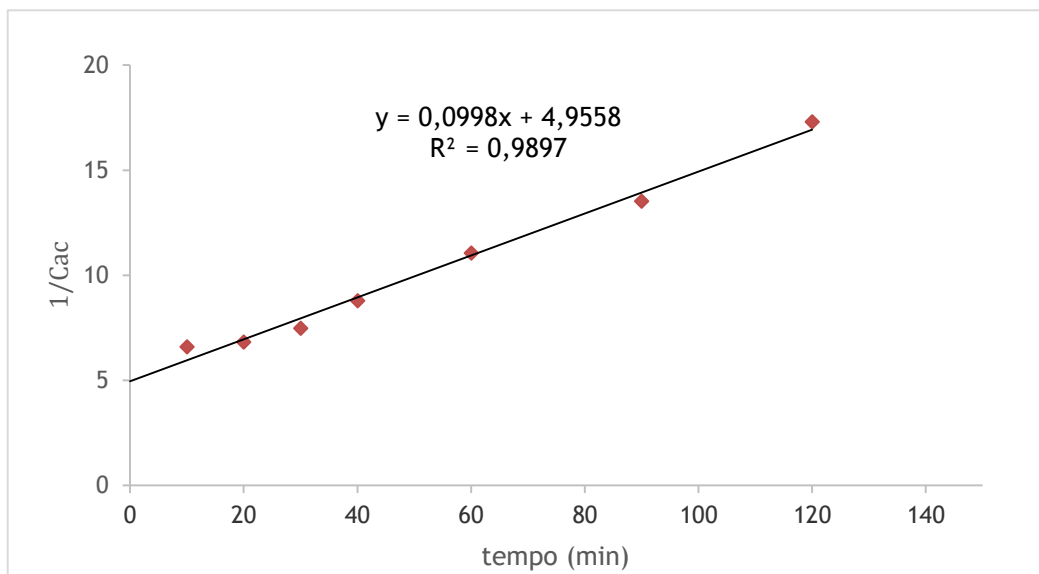


Figura 35 - Representação gráfica de $1/C_{\text{ácido oleico}}$ em função do tempo - cinética de 2ª ordem.

Como se pode concluir das Figuras 34 e 35, a cinética que mais se ajusta à reação de esterificação enzimática é a cinética de 2ª ordem, tendo-se obtido um coeficiente de correlação bastante satisfatório ($R^2 = 0,9897$).

Como é uma reação que envolve enzimas, seria de esperar que os pontos se ajustassem a uma cinética de Michaelis-Menten, no entanto, verifica-se um ajuste muito adequado à de 2ª ordem.

Como foram feitos ensaios a quatro temperaturas distintas (35 °C, 40 °C, 45 °C e 55 °C), foi possível calcular a energia de ativação (Ea) envolvida na reação. A Equação de Arrhenius é uma das formas mais usuais de representar a dependência da temperatura das constantes cinéticas de uma reação química, assumindo que uma constante cinética (k) pode ser expressa em função da temperatura pela seguinte expressão:

$$k = A \times e^{\frac{-Ea}{R \times T}}$$

em que A corresponde ao fator pré-exponencial, Ea à energia de ativação, R à constante dos gases ideais e T à temperatura.

Deste modo é possível obter valores da constante cinética k , que representam constantes cinéticas aparentes k_{app} . Manipulando a equação anterior, tem-se que:

$$\ln(k_{app}) = \ln(A) - \frac{Ea}{R \times T} \Leftrightarrow \ln(k_{app}) = \frac{-Ea}{R} \times \frac{1}{T} + \ln(A)$$

Assim, fazendo a representação gráfica de $\ln(k_{app})$ em função de $1/T$, obtém-se uma reta cujo declive é igual a $-Ea/R$ e a ordenada na origem é $\ln(A)$. A Tabela 6 apresenta os valores das

constantes cinéticas aparentes para as quatro temperaturas estudadas, resultado do declive dos ajustes à cinética de 2^a ordem.

Tabela 6 - Constantes cinéticas aparentes (*kapp*) para as temperaturas de 35 °C, 40 °C, 45 °C e 55 °C.

T (°C)	T (K)	1/T (K ⁻¹)	<i>kapp</i> (dm ³ .min ⁻¹ .mol ⁻¹)	<i>kapp</i> médio (dm ³ .min ⁻¹ .mol ⁻¹)	ln (<i>kapp</i>)
35	308,15	0,003245	0,0358	0,03565	-3,3340
			0,0355		
45	318,15	0,003143	0,0645	0,07025	-2,6557
			0,0760		
55	328,15	0,003047	0,0218	0,0205	-3,8873
			0,0192		
40	313,15	0,003193	0,0445	0,0445	-3,1123

Depois do cálculo das constantes cinéticas, fez-se a representação gráfica de *ln (kapp)* em função de *1/T*. Os resultados encontra-se na Figura 36.

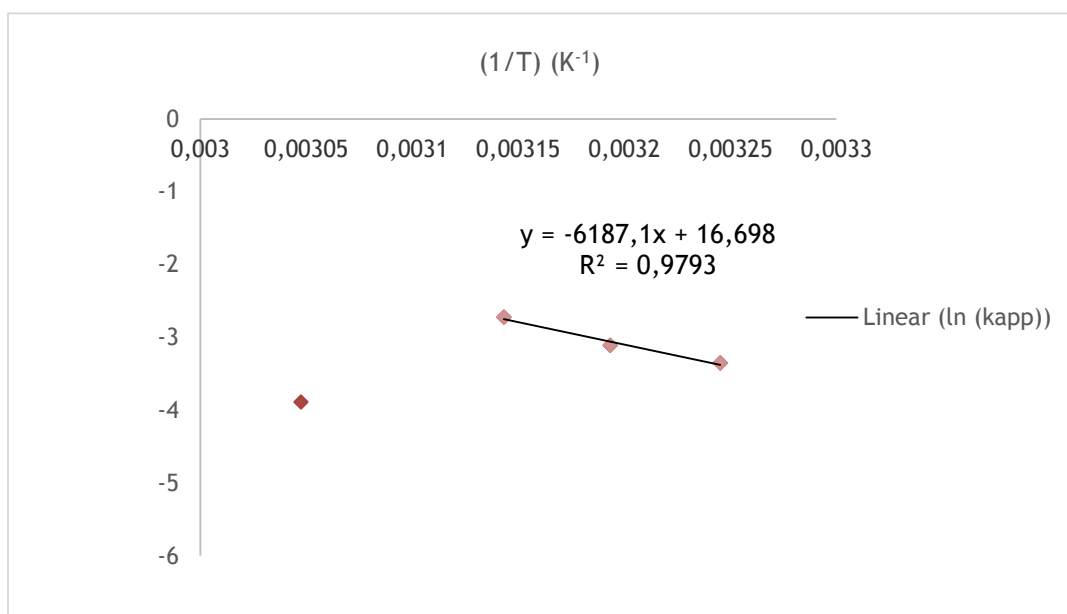


Figura 36 - Representação gráfica de *ln (kapp)* em função de *1/T*.

Como se observa na Figura 36, os pontos experimentais das quatro temperaturas não se ajustam a uma reta, devido ao facto de à temperatura de 55 °C, o valor da constante cinética aparente diminuir, em vez de aumentar. O motivo pelo qual isso poderá ter acontecido é a enzima ter começado a desnaturar e, devido a esse facto, não ter cumprido em pleno a sua função. Procedeu-se ao cálculo da energia de ativação apenas com as outras três temperaturas (35 °C, 40 °C e 45 °C) e os resultados estão representados na Tabela 7.

Tabela 7 - Valores da energia de ativação e fator pré-exponencial para a reação de esterificação enzimática às temperaturas de 35 °C, 40 °C e 45 °C.

Ea (kJ/mol)	51,44
A (dm³.min⁻¹.mol⁻¹)	$1,57 \times 10^7$

5 Conclusões

Os óleos de peixe foram caracterizados pelo seu índice de acidez (10-14 mg KOH/g de óleo), índice de iodo (109 - 219 g I₂/100 g óleo), viscosidade cinemática (32 - 34 mm²/s a 40 °C), densidade (0,932 - 0,937 g/cm³ a 15 °C) e humidade (0,5 - 1,8 % em peso).

Relativamente à caracterização das amostras que foi feita, verificou-se, tal como era esperado, que o índice de acidez do óleo da SAVINOR era bastante elevado e suscetível de aumentar, devido essencialmente ao tempo e condições de armazenamento.

A reação de esterificação enzimática mostrou ser uma solução bastante satisfatória, uma vez que permitiu uma redução de índice de acidez do óleo de peixe muito significativa. Para realizar a esterificação foram testadas 4 enzimas diferentes como catalisador (Novozym 435, Lipozyme RM IM, Lipozyme CALB L, Palatase 20000 L) e selecionada aquela que permitiu obter a maior redução de índice de acidez: Lipozyme® CALB de *Candida antarctica* lipase B da Novozymes. Foram estudadas condições de funcionamento diferentes: temperatura de reação (35, 45, 40 e 55 °C), tempo de reação (de 0 a 180 min), razão mássica enzima/óleo (0,00225 e 0,0045 m/m) e a razão mássica etanol/AGL (3,235, 4,879, 4,907 e 6,566 m/m).

Através dos resultados pôde concluir-se que as melhores condições de operação foram:

- Tempo de reação: 150 minutos;
- Temperatura de reação: 45 °C;
- Tipo de álcool: etanol (99,8% v/v);
- Razão mássica enzima/óleo: 0,0045 m/m;
- Razão mássica etanol/AGL: 4,879 m/m.

Reunindo todas estas condições, atingiu-se mais de 76 % de redução de AGL em apenas um passo reacional. Este resultado podia ser ainda melhorado numa segunda esterificação, utilizando um método para remover continuamente a água formada durante a reação (por exemplo, uma secagem flash) ou fazendo a adição de álcool por etapas.

Os pontos experimentais ajustam-se a uma cinética de 2ª ordem e a energia de ativação envolvida na reação tem o valor de 51,44 kJ/mol.

Para além da sua eficácia na redução da concentração de AGL, concluiu-se que a esterificação enzimática catalisada reduz as perdas de óleo em comparação com a neutralização alcalina, devidas ao óleo arrastado na formação de sabões. Além disso, a reação tem lugar a temperaturas mais suaves (< 60 °C), reduzindo o consumo de energia e custos associados, tornando-se assim uma solução económica e ambientalmente sustentável. A esterificação química preserva ainda as propriedades nutricionais do óleo, sendo menos sensível à presença de humidade no óleo do que a reação química catalisada.

Referências

- Adene-Ineti, Energias Renováveis em Portugal, Uma Contribuição para os Objectivos de Política Energética e Ambiental. s.l. : ADENE e INETI, 2002.
- Aranda D.A.G., Santos R.T.P., Tapanes N.C.O., Ramos A.L.D., Antunes O.A.C., Acid-Catalyzed Homogeneous Esterification Reaction for Biodiesel Production from Palm Fatty Acids, *Catal. Lett.* 122:20-25, 2008.
- Araújo K. L. G. V., Epaminondas P. S., Lima A. E. A., Souza A. L., Queiroz N., Souza A. G., Implicação da degradação térmica nas propriedades físico-químicas do óleo de peixe. VII Congresso Brasileiro de Análise Térmica e Calorimetria, São Pedro - SP. 2010.
- Arruda, Priscila V., Rodrigues, Rita, Felipe, Maria, Glicerol: um subproduto com capacidade industrial e metabólica, *Revista Analytica*, Dezembro 2006/Janeiro 2007, Nº 26.
- Banco do Nordeste, Manual de Impactos Ambientais. Banco do Nordeste. Fortaleza CE.1999
- Bon E. P. S., Maria A., Ferrera M. A., Corvo M. L., Vermelho A. B., Paiva C. L. A., Alencastro R. B., Coelho R. R. R., *Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicação e Mercado*. Rio de Janeiro: Ed. Interciência, 2008.
- Brinkmann B., Quality criteria of industrial frying oils and fats. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 102(8-9): 539-541, 2000.
- Cabral J. M. S., Aires-Barros M. R., Gama M., *Engenharia Enzimática*. Lisboa: Lidel-Edições Técnicas, 2003.
- Castro e Melo, ANICP. A indústria conserveira em Portugal. Acedido em 01/02/2016, em http://www.drapc.min-agricultura.pt/base/geral/files/castro_e_melo_anicp.pdf
- Castro B. C. S., Otimização das Condições da Reação de Transesterificação e Caracterização dos Rejeitos dos Óleos de Fritura e de Peixe para Obtenção de Biodiesel. Rio de Janeiro, 2009. Dissertação - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.
- Costa Neto P. R., Rossi L. F. S., Zagonel G. F., Ramos L. P., Produção de biocombustível alternativo ao óleo diesel através da transesterificação de óleo de soja usado em frituras. *Química Nova*, 23(4):531-537, 2000.

Conteras-Guzmán E.S., Bioquímica de pescado e derivados. Funep. Jaboticabal. , p.409, 1994.

Directiva n.º 93/43/CEE, Relativa à higiene dos géneros alimentícios, Conselho das Comunidades Europeias. Jornal Oficial, L175 (14-06-1993): 0001-0011.

Feltes M. M. C., Correia J. F. G., Beirão L. H., Block J. M., Ninow J. L., Spiller V. R., Alternativas para a agregação de valor aos resíduos da industrialização de peixe. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental, Vol.14, No.6, pp. 669-677, ISSN 1415-4366. 2010.

Ferraz de Arruda L., Aproveitamento do resíduo do beneficiamento da tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*) para obtenção de silagem e óleo como subprodutos. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior De Agricultura “Luiz De Queiroz”, Universidade De São Paulo, Piracicaba, Brasil. p. 78. 2004.

International Standard ISO 3104, Petroleum Products - Transparent and Opaque liquids - Determination of kinematic viscosity and calculation of dynamic viscosity, Second Edition, 10-15, 1994.

Lustosa Neto A. D., elaboração e caracterização química funcional e nutricional de ensilados de resíduos de pescado da família Lutjanidae. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brasil, p. 77, 2004.

Morales-Ulloa, D. F.; Oetterer, M. Bioconversão de resíduos da indústria pesqueira. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v.15, n.3, p.206-214, 1995.

Nelson D. L., Cox M. M., Princípios de bioquímica de Lehninger. São Paulo: Artmed, 2011.

Nunes M.L., Silva E.V., Alencar J.S.S., Maia Jr. W.M., Silagem de resíduos de pescado: estudo comparativo dos produtos obtidos por processo químico e por bioconversão. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 15, Poços de Caldas/MG, Resumos...p 127, 2011

Norma Portuguesa NP EN 14104, Produtos derivados de óleos e gorduras. Ésteres metílicos de ácidos gordos (FAME). Determinação do Índice de Acidez, 2011.

Norma Portuguesa NP EN 14111, Produtos derivados de óleos e gorduras. Ésteres metílicos de ácidos gordos (FAME). Determinação do Índice de Iodo, 2009.

Norma Portuguesa NP 938, Gorduras e óleos comestíveis. Determinação da Massa Volúmica. Processo de referência (pelo picnómetro), 1988.

O'Brien R. Fats and Oils. Formulating and Processing for Applications. Second Edition, Boca Raton: CRC Press, 2004.

Oliveira D., Oliveira J. V. F. C., Menocin S., Amroginski C., Influência das variáveis de processo na alcoólise enzimática de óleo de mamona. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v.24, n.2, p.178-182. 2004.

Pacheco M.T.B, Barrera-Arelanno D., Fraccionamiento del aceite de hígado de tiburón azul (Prionace glauca) y su estabilización con antioxidantes = Blue shark liver oil (Prionace glauca): Fractionation and stabilization with antioxidants. 1994.

Pessati M. L., Aproveitamento dos sub-produtos do pescado. Itajaí: MAPA/UNIVALI. p.130. 2001.

Seibel N. F., Sosres L. A. de S., Produção de silagem química com resíduos de pescado marinho. Brazilian Journal of Food Technology, v.6, n.2, p.333-337. 2003.

Vendrusco F., Ribeiro C. S., Espósito E., Ninow J. L., Tratamento biológico do bagaço de maçã e adição em dietas para alevinos. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental, v.13, n.4, p.487-493. 2009.

Viddoti R.M, Gonçalves G.S., Produção e caracterização de silagem, farinha e óleo de tilápia e sua utilização para alimentação animal. 2006.

Zuta P. C., Simpson B. K., Zhao X., Leclerc L., The effect of α -tocopherol on the oxidation of mackerel oil. Food Chemistry, v.100, p.800-807. 2007.

Anexo 1

Esterificação Química

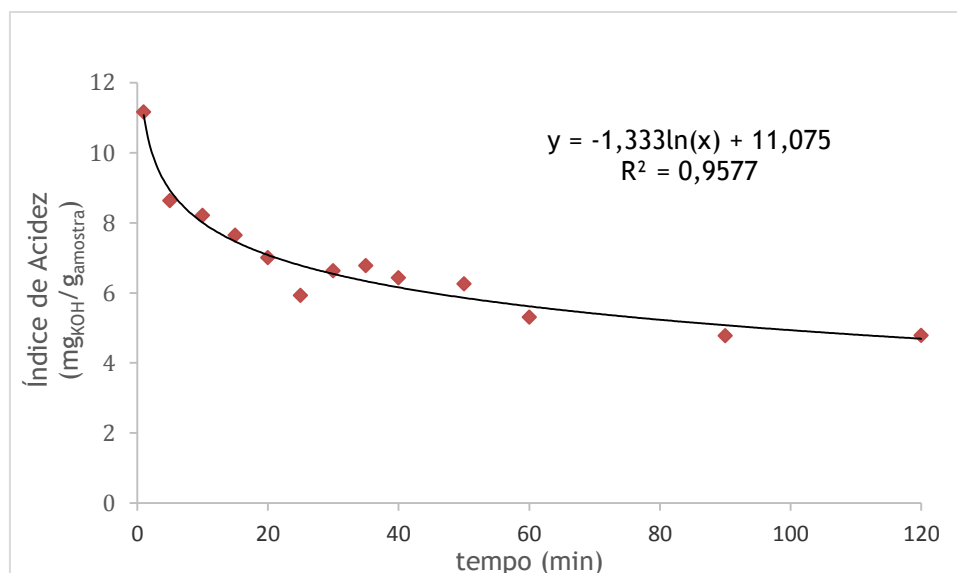


Figura 37 - Variação do índice de acidez em função do tempo a T=60 °C e 60 rpm, com uma razão catalisador/óleo de 0,003 m/m e uma razão mássica de álcool/AGL de 2,235 m/m (2º ensaio).

Esterificação Enzimática

Ensaio padrão

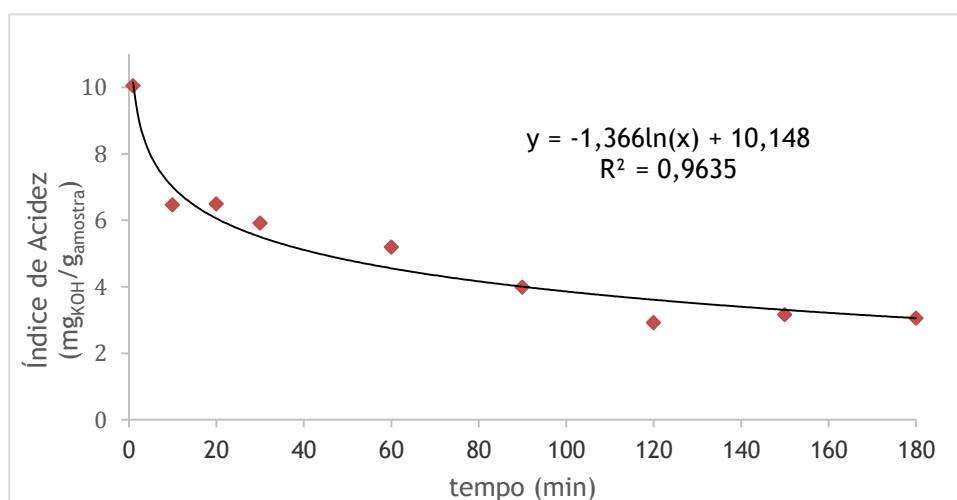


Figura 38 - Ensaio padrão da reação de esterificação enzimática: T=45 °C, na razão etanol/AGL de 3,14 m/m e na razão enzima/óleo de 0,00225 m/m (2º ensaio).

Variação temperatura de reação

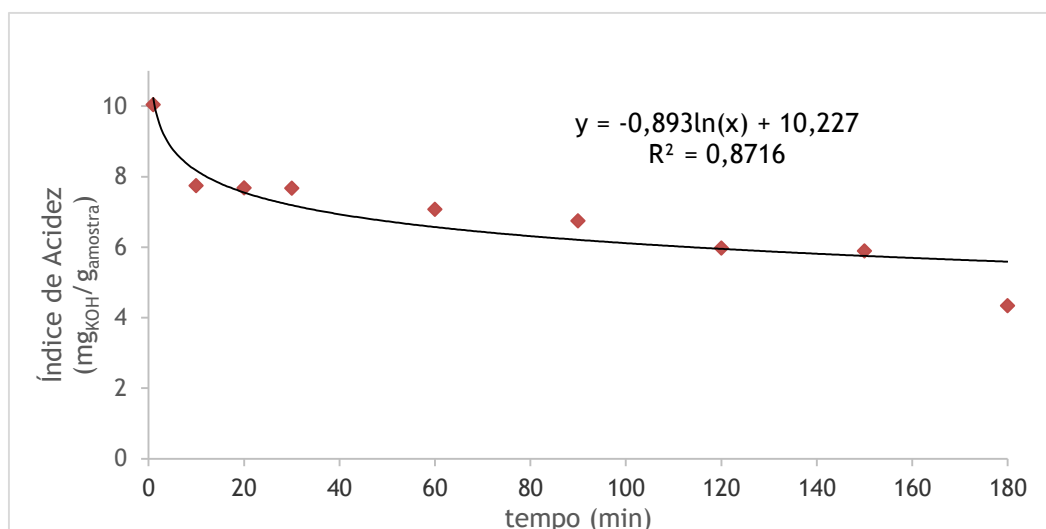


Figura 39 - Variação do índice de acidez em função do tempo a T=55 °C, na razão etanol/AGL de 3,14 m/m e na razão enzima/óleo de 0,00225 m/m (2º ensaio).

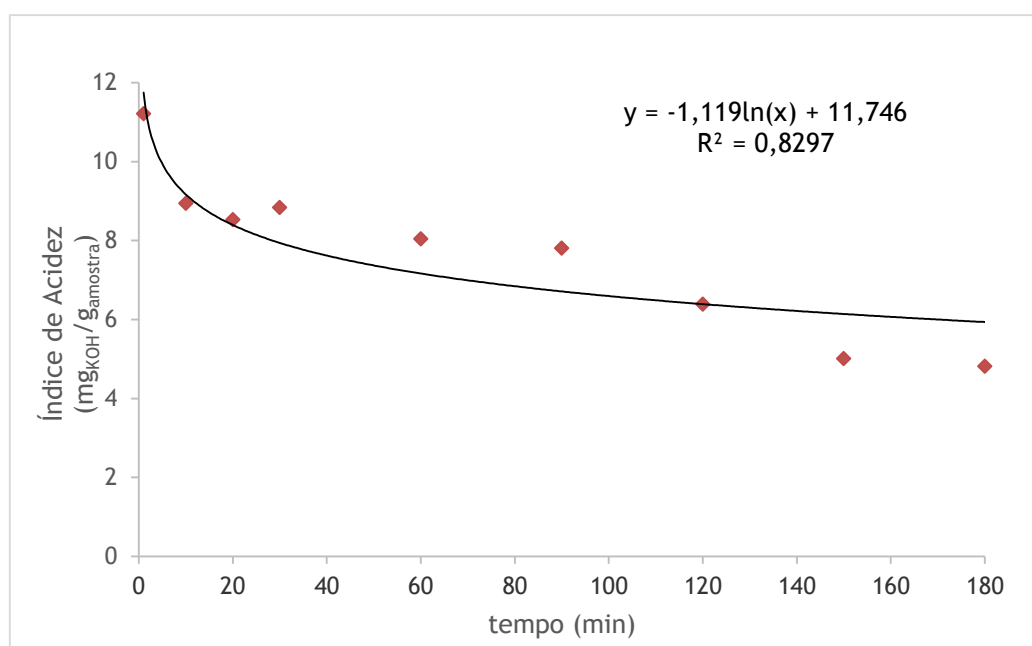


Figura 40 - Variação do índice de acidez em função do tempo a T=35 °C, na razão etanol/AGL de 3,283 m/m e na razão enzima/óleo de 0,00225 m/m (2º ensaio).

Variação razão mássica enzima/óleo

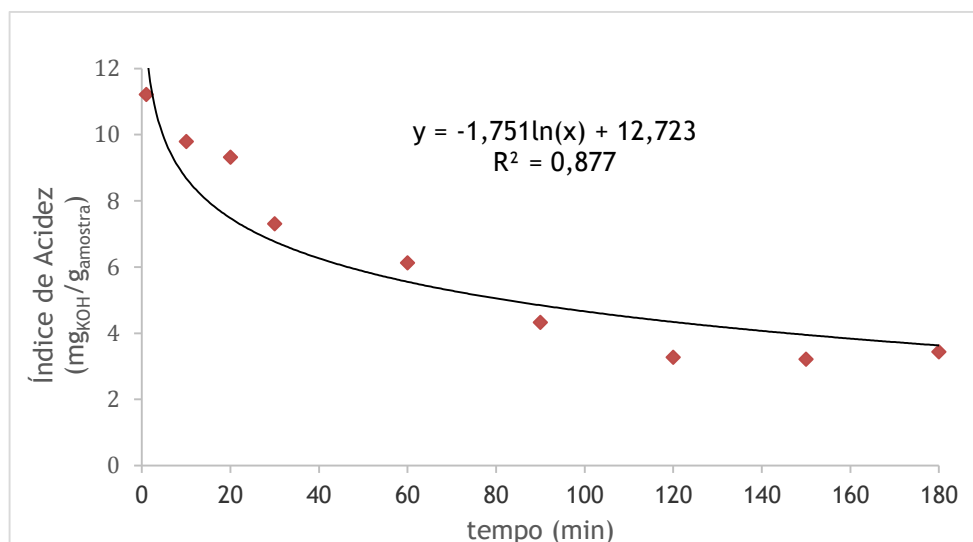


Figura 41 - Variação do índice de acidez em função do tempo a T=45 °C, na razão etanol/AGL de 3,283 m/m e na razão enzima/óleo de 0,0045 m/m (2º ensaio).

Variação razão mássica álcool/AGL

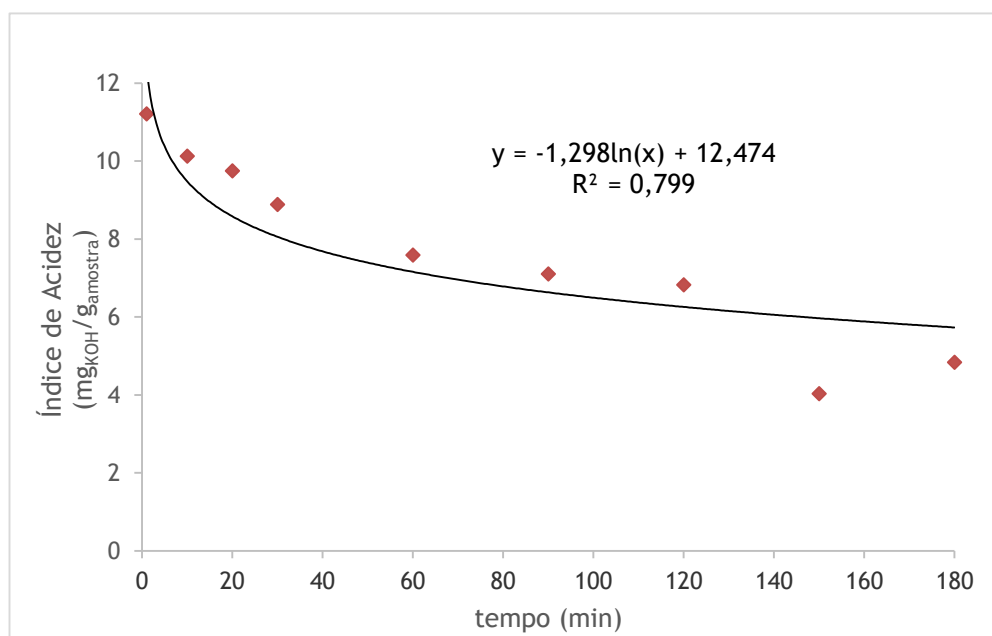


Figura 42 - Variação do índice de acidez em função do tempo a T=45 °C, na razão etanol/AGL de 6,566 m/m e na razão enzima/óleo de 0,00225 m/m (2º ensaio).

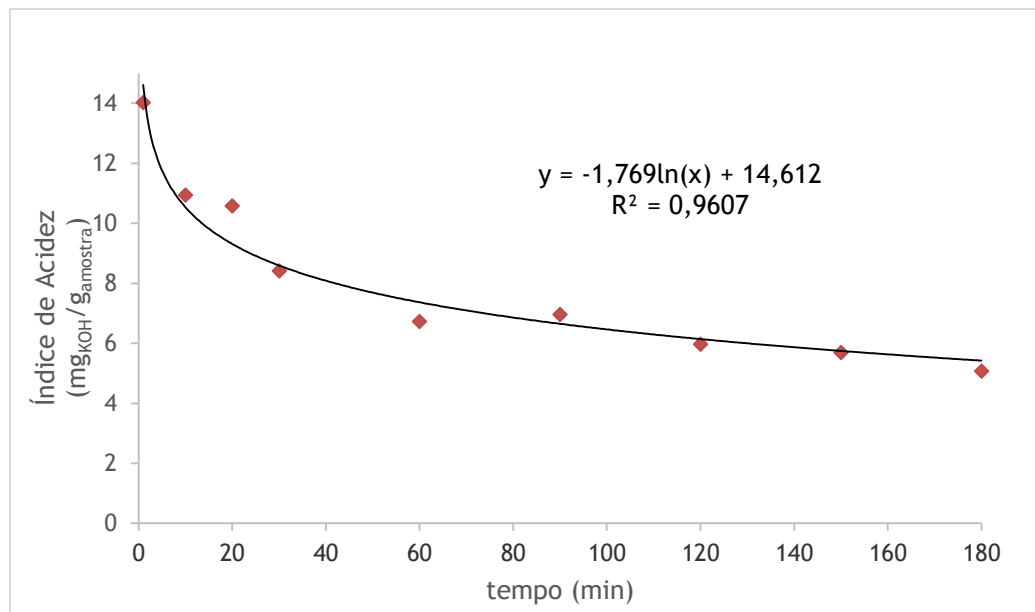


Figura 43 - Variação do índice de acidez em função do tempo a T=45 °C, na razão etanol/AGL de 4,907 m/m e na razão enzima/óleo de 0,00225 (2º ensaio).

Ensaio final - Melhores condições operacionais

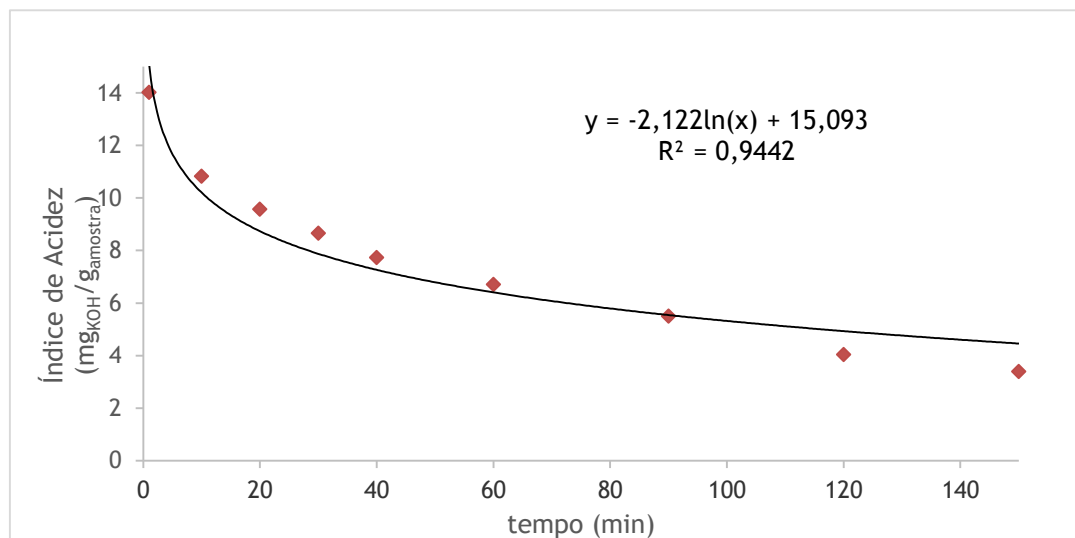


Figura 44 - Variação do índice de acidez em função do tempo a T=45 °C, na razão etanol/AGL de 4,879 m/m e na razão enzima/óleo de 0,0045 m/m (2º ensaio).

Cálculo da ordem de reação e da energia de ativação

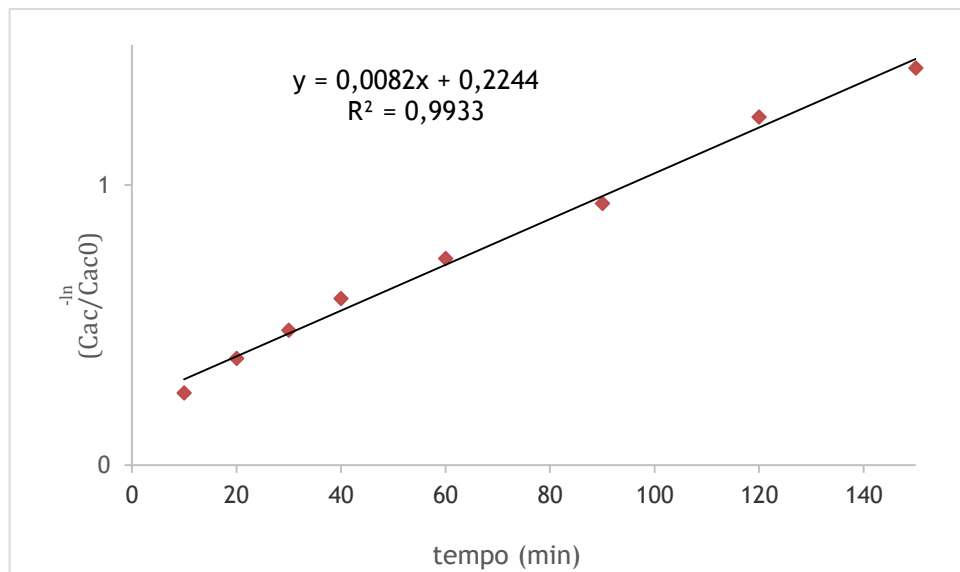


Figura 45 - Representação gráfica de $-\ln(C_{\text{ácido oleico}}/C_{\text{ácido oleico inicial}})$ em função do tempo - cinética de 1ª ordem (2º ensaio).

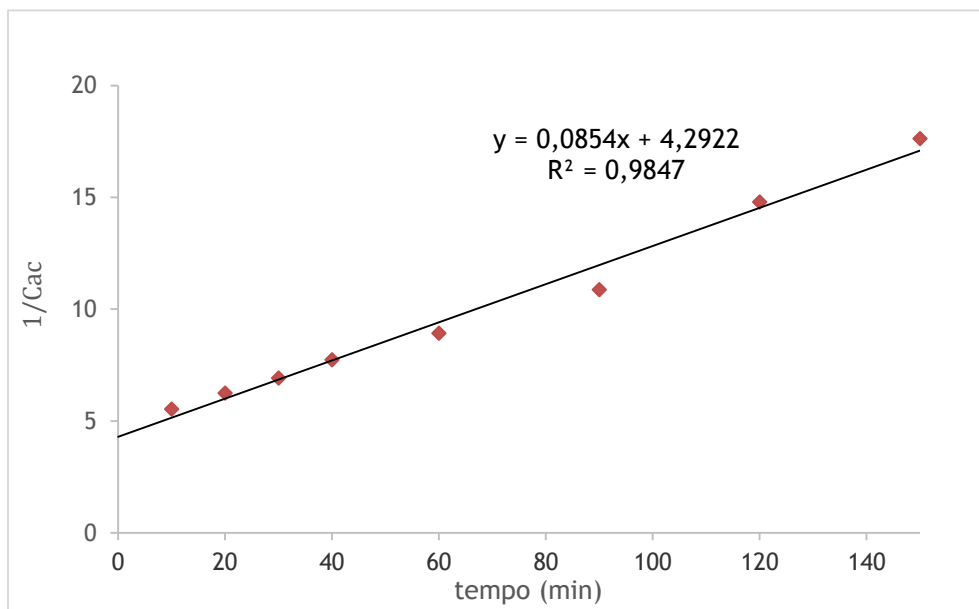


Figura 46 - Representação gráfica de $1/C_{\text{ácido oleico}}$ em função do tempo - cinética de 2ª ordem (2º ensaio).